

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

DISSERTATION

**Einfluss von Ethanol auf die Zytokinkonzentrationen in  
Milz und Lunge während einer postoperativen Pneumonie  
im Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Steffen Mühlbauer

aus Neindorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Spies  
2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Oppert  
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Pfitzmann

Datum der Promotion: 08.04.2011

*Krankheiten überfallen den Menschen nicht wie ein Blitz aus heiterem Himmel,  
sondern sind die Folgen fortgesetzter Fehler wider die Natur.*

*Hippokrates von Kos*

## **Publikationen**

Mit Genehmigung des Promotionsausschusses des Universitätsklinikums Charité wurden bereits vor Beendigung des Promotionsverfahrens Teile dieser Arbeit 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

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>8</u>
1.1	Alkohol und Bevölkerung	8
1.2	Alkohol und Medizin	8
1.3	Angeborenes und erworbenes Immunsystem	9
1.4	Immunologische Auswirkungen von chronischer Alkoholexposition	10
1.5	Immunologische Auswirkungen von akuter Alkoholexposition	12
1.6	Operativer Stress	13
1.7	Klebsiella pneumoniae	14
1.8	Zytokine	15
1.8.1	Interleukin-(IL-)1 $\beta$	15
1.8.2	Tumornekrosefaktor-(TNF-) $\alpha$	17
1.8.3	Interleukin-(IL-)6	18
1.8.4	Interleukin-(IL-)10	20
1.8.5	Interleukin-(IL-)4	21
1.9	Zielsetzung	23
<u>2</u>	<u>Methoden und Materialien</u>	<u>25</u>
2.1	Materialien	25
2.1.1	Substanzen für mikrobiologische Untersuchungen	25
2.1.2	Substanzen und Materialien für Behandlung der Tiere	25
2.1.3	Substanzen für Organlysepuffer	26
2.1.4	Standardgeräte für laboranalytisches Arbeiten	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Versuchstiere	26
2.2.2	Ausschlusskriterien	27
2.2.3	Aufschlüsselung der Gruppenbezeichnungen	27
2.2.4	Gruppenentsprechende Vorbehandlung der Tiere	28
2.2.5	Mediane Laparotomie unter Isofluran-Narkose	28
2.2.6	Erhebung des klinischen Scores und der Gewichtsveränderungen	29
2.2.7	Klebsiella pneumoniae	30
2.2.7.1	Herstellen einer Nährbouillon	30

---

2.2.7.2	Feststellung des Klebsiellentiters im Aliquot	30
2.2.7.3	Herstellung der Infektionslösung	31
2.2.8	Infektion und Shaminfektion	31
2.2.9	Tötung und Präparation der Tiere	32
2.2.9.1	Blutentnahme und Tötung	32
2.2.9.2	Präparation der Organe	32
2.2.10	Feststellung der Infektionsdosis im Tier	33
2.2.10.1	Mikrobiologische Untersuchung der Lungen	33
2.2.10.2	Mikrobiologische Untersuchung des Blutes	33
2.2.11	Alkoholkonzentrationsbestimmung	34
2.2.12	Herstellung von Organhomolysaten mit Abtrennung der Membranfraktion	34
2.2.13	Messung der Protein- und Zytokinkonzentrationen der aliquotierten Überstände	35
2.2.14	Messen der Interleukin 1 $\beta$ -Konzentrationen	35
2.2.15	Auswertung der gewonnenen Daten	37
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>38</b>
3.1	Ergebnisse der Interleukinmessungen	38
3.1.1	IL-1 $\beta$ in der Milz	38
3.1.2	IL-1 $\beta$ in der Lunge	40
3.1.3	TNF- $\alpha$ in der Milz	41
3.1.4	TNF- $\alpha$ in der Lunge	42
3.1.5	IL-6 in der Milz 44	
3.1.6	IL-6 in der Lunge	45
3.1.7	IL-10 in der Milz	46
3.1.8	IL-10 in der Lunge	47
3.1.9	IL-4 in der Milz 49	
3.1.10	IL-4 in der Lunge	51
3.2	Histologische Betrachtung	52
3.3	Mikrobiologische und chemisch-analytische Untersuchungsergebnisse von Lungen und Blut	54
3.3.1	Keimzahlen von <i>Klebsiella pneumoniae</i> in der Lunge	54

3.3.2	Nachweis einer Bakteriämie	55
3.3.3	Blutalkoholbestimmung	56
3.4	Auswertung des Gewichtsverhaltens und der klinischen Scores	57
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>59</u>
4.1	Diskussion der Ergebnisse der bestimmten proinflammatorischen Zytokine	60
4.1.1	IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$	60
4.1.2	IL-6	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse der bestimmten antiinflammatorischen Zytokine	64
4.2.1	IL-10	64
4.2.2	IL-4	66
4.3	Klinische, mikrobiologische und histologische Betrachtung	67
4.4	Methodenkritik	68
4.5	Zusammenfassung	70
4.6	Abstract	72
	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>74</u>
	<u>Anhang</u>	<u>84</u>
	Abbildungs- und Bildverzeichnis	84
	Tabellenverzeichnis	86
	Lebenslauf	88
	Danksagung	89
	Erklärung an Eides statt	90

# **1 Einleitung**

## **1.1 *Alkohol und Bevölkerung***

Der Konsum von Alkohol gehört weltweit seit Jahrhunderten zum menschlichen Brauchtum. Es gibt geschichtliche Dokumente, dass bereits die Sumerer zwischen 4500 bis 3000 v. Chr. ein dem Bier ähnliches Getränk brauten. Das Vergären von Honig, Früchten und anderen kohlenhydratreichen Lebensmitteln ermöglichte die Gewinnung von Wein, Met, Bier und anderen Spirituosen. In Europa tauchten erst im Mittelalter Destillierapparate auf, die es ermöglichten, höher konzentrierten Alkohol herzustellen.

Heute gehört Alkohol zur Weltspitze der missbrauchten Drogen. 2001 lag allein in Deutschland der Alkoholverbrauch pro Einwohner bei 9,9 Liter reinem Ethanol pro Jahr.

Gesellschaftlich und ökonomisch spielt Alkohol mit seinen Folgen heutzutage eine bedeutende Rolle. So wurden in Deutschland im Jahr 2002 24,4 Milliarden Euro für die Behandlung alkoholbedingter Krankheiten ausgegeben. Dies entsprach 1,16% des Bruttoinlandsproduktes. Es sterben in Deutschland rund 48000 Menschen pro Jahr an den Folgen von Alkohol <sup>(107)</sup>.

## **1.2 *Alkohol und Medizin***

Erhöhter Alkoholkonsum ist heutzutage ein weit verbreitetes Problem in vielen Fachdisziplinen der Medizin. So ist Alkoholmissbrauch bei jedem fünften Patienten, der in ein Allgemeinkrankenhaus aufgenommen wird, nachzuweisen. Dabei ist ab einer täglichen Trinkmenge von mehr als 60 Gramm reinen Ethanols von einem klinisch relevanten Alkoholmissbrauch auszugehen <sup>(77)</sup>. In zwei Dritteln der untersuchten Fälle waren Alkoholfolgekrankheiten der Grund für die stationäre Aufnahme. Derselben Studie zufolge betreiben 1/6 bis 1/4 aller in chirurgischen Abteilungen aufgenommenen Patienten Alkoholmissbrauch. Damit liegt die Prävalenz auf einer Linie mit dem Patientengut in neurologischen, psychiatrischen und internistischen Kliniken <sup>(47)</sup>. Ein über lange Zeit betriebener chronischer



Alkoholmissbrauch hat negative Auswirkungen auf alle wichtigen Organsysteme, wie das Nerven- und Herz-Kreislauf-System, die Leber, das Immunsystem, die Blutgerinnung und die Hämatopoese<sup>(76,78,90)</sup>. Neben Erkrankungen wie Leberzirrhose und Pankreatitis treten vermehrt maligne Neoplasien im Bereich der oberen Luftwege, des Verdauungstraktes und der Leber auf<sup>(58)</sup>.

Studien zufolge geben 50% der traumatologischen Patienten anamnestisch Alkoholabusus an<sup>(28,75)</sup>. Posttraumatisch sind Komplikationen bei diesen Patienten 2-4fach erhöht<sup>(1,75,102)</sup>. Alkoholabhängige Patienten haben zudem eine um 50% verlängerte Krankenhausverweildauer<sup>(93,94,92)</sup> und benötigen häufiger operative Folgeeingriffe. Die postoperative Morbidität und Mortalität sind bei chronisch alkoholabhängigen Patienten deutlich erhöht<sup>(72,76)</sup>, insbesondere durch Komplikationen wie Pneumonien, Sepsis, Blutungen, kardiopulmonale Insuffizienz, aber auch Wundinfektionen und Wundrupturen<sup>(91)</sup>.

Eine der häufigsten Komplikationen von Intensivpatienten ist die Pneumonie<sup>(73,76,79)</sup>. Häufig wurde als verursachender Keim *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) nachgewiesen<sup>(51,62)</sup>, wobei sowohl die Häufigkeit als auch der Schweregrad und die Mortalität von Klebsiellen-Pneumonien bei Alkoholikern deutlich erhöht sind<sup>(27)</sup>. Auch für ambulant erworbene Pneumonien erwies sich erhöhter Alkoholkonsum bereits als Risikofaktor<sup>(62)</sup>. Als Ursache dafür werden unter anderem die sedierenden Eigenschaften des Alkohols angesehen, die zu einem verringerten oropharyngealen Tonus führen. Dies wiederum führt zu einer verschlechterten mukoziliären Clearance, zu einem abgeschwächten Hustenreflex und so zu einem höheren Aspirationsrisiko.

### **1.3 Angeborenes und erworbenes Immunsystem**

Das Immunsystem ist für den Schutz des Organismus zuständig. Die so genannte angeborene Immunität hat sich dabei evolutionär unter dem Selektionsdruck von angreifenden Mikroorganismen entwickelt.

Neben den mechanischen Barrieren der angeborenen Immunität wie den Epithelien gehören zu ihr das Komplementsystem, viele Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Interferone sowie eine zelluläre Komponente, welche Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, Dendritische Zellen und NK-Zellen beinhaltet.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach Eindringen eines Pathogens erfolgt dabei über die Pattern-Recognition-Receptors (*PRRs*), wenn diese so genannte Pathogen-Associated Molecular Patterns (*PAMPs*) binden. Bei den *PAMPs* handelt es sich um typische mikrobielle Bestandteile, welche dem Immunsystem über die Bindung an die *PRRs* die Anwesenheit von Pathogenen vermitteln<sup>(42)</sup>. Über diese Aktivierung kommt es zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), kostimulatorischen Faktoren zur T-Zell-Aktivierung und Botenstoffe, die die Pathogenbekämpfung koordinieren und kontrollieren, wie Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Es resultiert eine Reduktion der eindringenden Keime und über ein komplexes Netzwerk, welches unter anderem die Sekretion inflammatorischer Mediatoren, Phagozytose, Opsonierung und die Antigenpräsentation über MCH-II-Oberflächenmarker beinhaltet, wird die spezifische Immunantwort durch die B- und T-Zellpopulation induziert.

Nachfolgend ist es eine multifaktorielle Entscheidung, in welcher Qualität und Intensität die spezifische Immunantwort abläuft, um den Organismus gesund zu erhalten. Der Abwehr einer Virusinfektion dienen vor allem spezifische zytotoxische T-Lymphozyten, gegen eine extrazelluläre bakterielle Infektionen sind spezifische Antikörper erforderlich, wohingegen der Organismus auf Parasiten mit einer Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen reagieren muss.

Ziel all dieser komplexen Vorgänge ist die Vernichtung des eingedrungenen Pathogens sowie die Ausbildung einer Gedächtnisreaktion. Im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem Antigen kann so für eine schnellere und effektivere Immunreaktion gesorgt werden.

#### **1.4 Immunologische Auswirkungen von chronischer Alkoholexposition**

Chronischer Alkoholkonsum führt beim Menschen zur Immundefizienz und damit zu einer erhöhten Anfälligkeit für infektiöse Erkrankungen. So treten Pneumonien bei chronisch Alkoholkranken bis zu 4-fach häufiger auf als bei Nicht-Alkoholikern<sup>(8,38)</sup>. Bei chirurgischen Patienten, wo schädlicher Alkoholgebrauch bekannt war, zeigte

sich bereits präoperativ, dass sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunantwort verändert waren <sup>(51,82)</sup>. Die zugrunde liegenden immunologischen Auswirkungen von Alkoholkonsum wurden vielfach untersucht und für die resultierende erhöhte Infektanfälligkeit konnten bereits multiple Veränderungen in weiten Bereichen des ganzen Immunsystems belegt werden.

Hinsichtlich der immunologischen Auswirkungen ist zwischen chronischem Alkoholkonsum mit und ohne Leberbeteiligung zu unterscheiden. So konnte bei chronischen Alkoholikern ohne Leberschädigung eine deutliche Verringerung der TNF- $\alpha$ -Produktion von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und eine Verminderung der TNF- $\alpha$ - und IL-12-Ausschüttung von mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Monozyten dargestellt werden. Im Frühstadium einer Sepsis waren zudem bei Alkoholkranken die plasmatischen Konzentrationen von IL-1 $\beta$  und IL-6 signifikant erniedrigt <sup>(34,15,55)</sup>. Erhöhte Zellzahlen von aktivierten CD8<sup>+</sup>-Zellen und eine verminderte Expression von HLA-DR auf CD4<sup>+</sup> Zellen konnten ebenfalls als Effekt von chronischer Ethanolexposition belegt werden <sup>(9)</sup>.

Bei Patienten mit bereits bestehender Leberschädigung waren die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  durch NK-Zellen wiederum erhöht <sup>(24)</sup> und nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors erfolgte eine deutlich vermehrte Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch CD57<sup>+</sup>-T-Zellen <sup>(71)</sup>. Bei chronisch alkoholkranken Patienten mit Vorliegen von alkoholischer Lebererkrankung (*alcoholic liver disease* - ALD) zeigte sich sowohl eine spontan erhöhte als auch eine nach Stimulation mit LPS nochmals vermehrte monozytäre TNF- $\alpha$ -Produktion. Gleichzeitig konnte eine deutlich erniedrigte Produktion von IL-10 bei diesen Patienten beobachtet werden. Bei Patienten mit ALD besteht vermehrter oxidativer Stress u. a. durch Fehlen von adäquaten Spiegeln von Antioxidanzien. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- $\kappa$ B, wodurch wiederum die IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -Produktion verstärkt wird. Die häufig beobachtete Steigerung der TNF-Rezeptordichte, eine durch vermehrte TNF- $\alpha$ -Produktion bedingte positive Feedbackschleife und die bei Portalhypertension per se bestehende vermehrte Aktivierung von Monozyten und proinflammatorische Zytokinproduktion führt bei Patienten mit chronischem Alkoholkonsum und bestehender ALD zu einer chronischen proinflammatorischen Aktivierung <sup>(41,56)</sup>.

## 1.5 ***Immunologische Auswirkungen von akuter Alkoholexposition***

Akute Alkoholexposition *in vitro* führte vielfach zu einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 und zu einer Erhöhung des potent antiinflammatorischen IL-10 <sup>(39,50,86,83,100)</sup>. In weiteren Untersuchungen fanden Szabo et al. verringerte Konzentrationen von IL-1 und TNF- $\alpha$  bei stimulierten humanen Blutmonozyten. Neben der Verminderung der sezernierten Proteine zeigte sich auch ein quantitativer Rückgang der spezifischen mRNA. Dieser inhibitorische Effekt wurde einerseits dem signifikanten Anstieg der IL-10-Werte zugeschrieben, andererseits wurde aber auch ein von IL-10 unabhängiger Weg vermutet <sup>(85)</sup>.

Zusätzlich zu erhöhten IL-10- und dadurch verringerten IFN- $\gamma$ -Leveln traten auch Störungen der T-Zell-Aktivierung durch akzessorische Dysfunktion, also eine Einschränkung der Vermittlerfunktion der Monozyten, bereits nach moderater Alkoholgabe auf <sup>(84)</sup>. Neben den Auswirkungen auf die pro- und antiinflammatorischen Zytokine konnte durch akute Alkoholexposition *in vitro* ebenfalls klar eine verminderte Proliferation von antigen-spezifischen T-Zellpopulationen nachgewiesen werden <sup>(86)</sup>.

Auch die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge während einer Streptokokkenpneumonie war bei Ratten nach akuter Alkoholexposition stark vermindert. Dieser Umstand war einer Konzentrationsverringerung der chemotaktischen Proteine zuzuschreiben und führte somit zu einer erhöhten bakteriellen Belastung des Lungengewebes und zu einer gesteigerten Mortalität <sup>(6)</sup>. Auch in tierexperimentellen Modellen, die sich mit Endotoxämien beschäftigten, wurde eine verringerte chemotaktische Aktivität durch akute Alkoholgabe beobachtet <sup>(110)</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Konsum von Alkohol eine Vielzahl an immunologischen Veränderungen zur Folge hat. Diese führen sowohl über die Beeinflussung der zellulären Immunität als auch durch die Alteration der humoralen Immunität zu einer gestörten Immunabwehr auf eindringende Erreger.

## 1.6 Operativer Stress

Operativer Stress führt zu einer ganzen Reihe von Immundysregulationen und ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit assoziiert <sup>(44)</sup>.

Nach operativen Eingriffen kommt es zu einer Akut-Phase-Reaktion, welche das Ziel hat, Gewebeschaden zu kontrollieren, eindringende Pathogene abzutöten und Reparationsprozesse einzuleiten <sup>(68)</sup>. Diese beinhaltet unter anderem, dass im Operationsgebiet Makrophagen und Monozyten aktiviert werden, die daraufhin proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  freisetzen <sup>(2)</sup>. Daraufhin folgt die Sekretion von weiteren Zytokinen wie z. B. IL-6. Dabei ist die Größe der Wundfläche wesentlich mitentscheidend für die Konzentrationen der ausgeschütteten Zytokine <sup>(10,19)</sup>. Gerade nach ausgedehnten Eingriffen kommt es so zu sehr hohen Gewebespiegeln von unter anderem IL-6. Dieses stimuliert Makrophagen, vermehrt antiinflammatorische Mediatoren zu exprimieren, wie z. B. den IL-1-Rezeptor-Antagonist und lösliche TNF-Rezeptoren <sup>(89)</sup>. Über die Herabregulation vieler proinflammatorischer Zytokine führen diese hohen Konzentrationen von IL-6 zu einer Imbalance im Zytokinmilieu und resultierend daraus kann dies zu einem frühpostoperativen antiinflammatoric-response-syndrome führen <sup>(46)</sup>. Diese posttraumatische Immunsuppression ist gekennzeichnet durch geringe Spiegel von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  und durch deutliche Konzentrationserhöhungen von IL-6 und IL-10 <sup>(5,54)</sup>. Diese postoperative Erhöhung des IL-10 wird dabei als gewebeprotective Maßnahme des Körpers interpretiert, ist aber ein Hauptgrund für das Auftreten von infektiösen Komplikationen am 3. postoperativen Tag <sup>(101)</sup>.

Eine adäquate zelluläre Immunität hängt nicht nur von den Funktionen der Monozyten und der T-Zellen allein ab, sondern vor allem auch von deren Interaktion. So zeigte sich unter Stresssituationen wie Trauma und Sepsis, dass monozytär große Mengen von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sezerniert wurden. Dies führte zu einer deutlichen Herabregulation der HLA-DR-Rezeptor-Expression und zu einem Verlust von Antigen-Präsentation der Monozyten.

Große chirurgische Eingriffe führten ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung und erhöhten Apoptoseraten der CD<sup>4+</sup> und CD<sup>8+</sup> T-Lymphozyten in Korrelation mit vermehrten postoperativen Infektionen. Als weiterer immunsuppressiver Faktor ist

zudem bekannt, dass operativer Stress zu einem Shift der  $T_{h1}/T_{h2}$ -Ratio hin zum  $T_{h2}$ -Subset der Interleukine, also zugunsten der Antiinflammation führt.

Zu alkoholbedingten immunologischen Veränderungen im Zusammenhang mit operativen Eingriffen gibt es bisher nur wenige publizierte klinische Studien. Sander et al. fanden bei alkoholkranken Patienten unmittelbar postoperativ eine verminderte IL-6/IL-10-Ratio, die mit einer erhöhten Infektionsrate während der nachfolgenden intensivmedizinischen Behandlung verbunden war. Die  $T_{h1}/T_{h2}$ -Ratio unterschied sich postoperativ nicht zwischen alkoholkranken und nicht-alkoholkranken Patienten, während präoperativ die Ratio bei den alkoholkranken Patienten reduziert war. Operativer Stress und plötzliche Alkoholabstinenz verstärkten die immunsuppressive Wirkung von Ethanol zusätzlich <sup>(63,79)</sup>.

Während die immunmodulatorische Wirkung von Ethanol und operativem Stress gut verstanden ist, gibt es bisher kein geeignetes Modell, welches die immunmodulatorischen Faktoren Alkohol und Operation zusammen betrachtet und deren Einfluss auf die Immunantwort anhand einer postoperativ induzierten Infektion darstellt.

## **1.7 Klebsiella pneumoniae**

Klebsiellen gehören zur großen Familie der Enterobacteriaceae und entsprechend der so genannten K-Antigene unterscheidet man 77 Serotypen. Bisher nahm man an, dass *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* die einzigen für den Menschen pathogenen Unterspezies wären, jüngst zeigten sich jedoch auch *K. planticola* und *K. terrigena* ursächlich für infektiöse Prozesse beim Menschen.

*K. pneumoniae* ist ein gramnegatives, aerobes, unbewegliches Stäbchen, welches von einer Polysaccharidkapsel umgeben ist, in welcher sich das K-Antigen und Lipopolysaccharide (LPS), das so genannte O-Antigen befinden. Funktionell schützt sich *K. pneumoniae* mit diesen Antigenen vor Phagozytose und gegen Serumbakterizide, insbesondere gegen das Komplementsystem und führt zu den während Pneumonien häufig beobachteten Nekrosen im infizierten Gewebe und gegebenenfalls zum septischen Schock <sup>(57)</sup>.

Neben der durch Klebsiellen verursachten Pneumonie, treten häufig sowohl Infektionen der ableitenden Harnwege als auch Wundinfekte auf. Die komplizierten Verläufe von Klebsiellenpneumonien gehen mit dem Befall mehrerer Lungenlappen

einher und führen durch ihr rasches Fortschreiten und die Formation von Abszessen häufig zu Komplikationen <sup>(7)</sup>.

Durch die Kolonisierung von pathogenen Keimen im Nasopharynxbereich <sup>(17,106)</sup>, die bei Alkoholikern erhöhte Pneumonierate <sup>(14,51,82)</sup>, die zunehmende Resistenzlage gegenüber Antibiotika <sup>(36)</sup> und das im Vergleich mit nicht alkoholkranken Patienten deutlich erhöhte Letalitätsrisiko <sup>(69)</sup> von Pneumonien unterstreichen die Bedeutung von *K. pneumoniae* in der heutigen Intensivmedizin.

## **1.8 Zytokine**

Nachdem in den 1950er bis 1970er Jahren eine ganze Reihe von sogenannten Proteinfaktoren, welche von diversen Zellen gebildet und verschiedenste Effekte auf andere Zellen hatten, entdeckt wurden, weiß man heute, dass Zytokine eine heterogene Gruppe von Proteinen sind, welche per Rezeptorbindung Zellwachstum, Differenzierung und Reparaturvorgänge steuern. Weiterhin sind sie immens wichtig, um die Inflammation nach Eindringen eines Pathogens in den Organismus einzuleiten. Dabei werden sie im Wesentlichen von Leukozyten, aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Über deren Bindung an verschiedenste Rezeptoren kommt es sowohl zu lokalen als auch zu systemischen Effekten <sup>(68)</sup>.

### **1.8.1 Interleukin-(IL-)1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  ist ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin, was sehr früh während einer Entzündung auftritt und wichtiger Mediator im Entzündungsgeschehen ist, vor allem am Ort der Infektion, wie zum Beispiel im pulmonalen Gewebe während einer Pneumonie <sup>(97)</sup> ist. IL-1 $\beta$  liegt dabei intrazellulär schon präsynthetisiert als membranständiges Protein vor <sup>(68)</sup>.

Es zeigte sich bei Pneumonien beatmeter Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der IL-1 $\beta$ -Konzentration und der Stärke der bakteriellen Belastung des Lungengewebes <sup>(108)</sup>.

Bei einer Klebsiellenpneumonie ist die unspezifische Abwehr durch Phagozyten wie vor allem Makrophagen und Neutrophile eminent. Zusammen mit TNF- $\alpha$  ist IL-1 $\beta$  ein

wichtiger Aktivator dieser Zellen und wird selbst vor allem von Makrophagen nach deren Stimulation durch Bakterien und bakterielle Produkte gebildet <sup>(12)</sup>.

Bei Tieren mit induzierter Klebsiellenpneumonie wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  außerordentlich wichtig für die bakterielle Clearance sind. Bei einer durch *K. pneumoniae* verursachten Pneumonie ließen sich bei IL-1 $\beta$ -knock-out-Mäusen keine signifikanten Unterschiede zu Wildtypmäusen im Krankheitsbild, der bakteriellen Belastung und im Überleben aufweisen <sup>(87)</sup>. Genauere Untersuchungen ergaben, dass offenbar die kompensatorische Produktion von TNF- $\alpha$  das Nichtvorhandensein von IL-1 $\beta$  ausgleichen konnte. Tanabe et al folgerten, dass bei der Abwehr einer durch *K. pneumoniae* ausgelösten Pneumonie TNF- $\alpha$  somit die weitaus bedeutendere Rolle zukommt.

Bei Untersuchungen der reaktiven Produktion von IL-1 $\beta$  und von polymorphnukleären Neutrophilen (PMN) nach intranasaler Verabreichung von 10<sup>7</sup> CFU Klebsiellen zeigten sich die höchsten Konzentrationen von IL-1 $\beta$  12 Stunden post infectionem <sup>(4,70)</sup>.

In einem Experiment wurde die IL-1 $\beta$ -Produktion von humanen Blutmonozyten vor und nach akuter systemischer Ethanolexposition bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die mit LPS bzw. Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB) stimulierten humanen Blut-Monozyten, welche 16 Stunden nach Ethanolgabe extrahiert wurden, vergleichsweise deutlich geringere Mengen von IL-1 $\beta$  produzierten. Dies stützt ebenfalls die Theorie, dass bereits akuter Ethanol-Konsum die Sekretion von für die Immunantwort wichtigen Botenstoffen vermindern und somit die mögliche Infektgefahr beim Menschen erhöhen kann <sup>(81)</sup>.

Sowohl für akute als auch für chronische Ethanolexposition wurde als Folge eine verminderte poststimulatorische Sekretion von IL-1 $\beta$  durch Monozyten beschrieben. Eine Endotoxintoleranz, welche durch operative Eingriffe hervorgerufen werden kann, hat auf IL-1 $\beta$  im Vergleich mit TNF- $\alpha$  deutlich geringere Auswirkungen <sup>(111)</sup>.

Anhand der vorliegenden Daten aus anderen Studien ist bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren post infectionem mit einem geringeren Anstieg des IL-1 $\beta$  zu rechnen.



## 1.8.2 Tumornekrosefaktor-(TNF-) $\alpha$

TNF- $\alpha$  wirkt stark synergistisch mit IL-1 $\beta$ . So initiiert es Kaskaden von inflammatorischen Mediatoren, Zytokinen, das Komplementsystem und aktiviert Lymphozyten und Makrophagen <sup>(68)</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Tumornekrosefaktoren essentiell für die optimale Koordination sowohl bei der Differenzierung der T<sub>h1</sub>-Unterpopulation als auch für die Ausbildung von Granulomen und für die wirksame Eindämmung des Erregerwachstums bei Infektionen mit Mykobakterien sind. TNF- $\alpha$  erhöht die Phagozytose-Aktivität von Makrophagen und rekrutiert durch Stimulation zur Bildung von Chemokinen und Zell-Adhäsionsmolekülen inflammatorische Zellen, insbesondere mononukleäre Zellen, an den Ort der Entzündung <sup>(3,13,60)</sup>.

Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung von Alveolarmakrophagen ist bei chronischen Alkoholikern unter LPS-Stimulation vermindert <sup>(55)</sup>. Im Tiermodell und bei humanen Blutmonozyten konnte ebenfalls eine verringerte TNF- $\alpha$ -Produktion von Makrophagen und eine supprimierte IL-1 $\beta$ -Antwort nach Traumta bzw. Entzündungsreizen sowohl unter akutem als auch unter chronischem Alkoholeinfluss nachgewiesen werden <sup>(11,82)</sup>. Lanzke et al. beobachteten bei Balb/c-Mäusen nach 8tägiger Ethanol-Applikation im Rahmen einer Klebsiellenpneumonie deutlich erhöhte Zahlen von TNF- $\alpha$  produzierenden CD<sup>4+</sup> und CD<sup>8+</sup>-T-Zellen, bei gleichzeitiger Verminderung der IFN- $\gamma$ -produzierenden CD<sup>4+</sup> und CD<sup>8+</sup>-T-Zellen.

Bei einer durch *K. pneumoniae* verursachten Pneumonie ließen sich bei IL-1 $\beta$ -knock-out-Mäusen keine signifikanten Unterschiede zu Wildtypmäusen im Krankheitsbild, in der bakteriellen Belastung und im Überleben aufweisen <sup>(87)</sup>. Genauere Untersuchungen ergaben, dass offenbar die kompensatorische Produktion von TNF- $\alpha$  das Nichtvorhandensein von IL-1 $\beta$  ausgleichen konnte.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann chronischer Alkoholkonsum sowohl eine Verminderung als auch eine Verstärkung der TNF- $\alpha$ -Antwort bedingen. Somit ist abzuwarten, inwiefern Alkoholkonsum und die postoperative Toleranzentwicklung einen gegebenenfalls additiven Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung im Rahmen einer postoperativ induzierten Klebsiellenpneumonie haben.

### 1.8.3 Interleukin-(IL-)6

Zusammen mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gilt IL-6 als einer der Hauptinitiatoren der Akute-Phase-Reaktion, welche unter anderem aus Fieber, Corticosteronproduktion und der hepatischen Produktion der akuten Phase Proteine besteht. Es wird in Geweben freigesetzt, welche homöostatischen Störungen, Traumen, Endotoxämien und anderen akuten Entzündungsgeschehen unterliegen. IL-6 wird deshalb als Marker für das Ausmaß von Gewebedestruktion angesehen <sup>(5,18)</sup>.

Eine vermehrte Produktion von IL-6 kann durch verschiedene Reize wie antigenetische Stimulation durch mikrobielle Krankheitserreger, Lipopolysaccharide, IL-1, TNF, Interferon und Viren induziert werden. Produziert wird IL-6 von vielfältigen ortständigen Gewebezellen, wie unter anderem Fibrozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie von immunkompetenten Zellen der monozytären Zellreihe.

Zusätzlich zu den proinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 spielt dieses Molekül eine bedeutende Rolle in dem gesamten Prozess der Immunabwehr und –antwort. Ebenso in der Hämatopoese und Aktivierung der T<sub>h1</sub>-Antwort, wo IL-6 als kostimulatorisches Signal für die Reifung der CD<sup>4+</sup>-Lymphozyten agiert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 überaus wichtig in der Bekämpfung vor allem von sich schnell ausbreitenden mikrobiellen Entzündungsgeschehen ist. IL-6-defiziente Mäuse waren weitaus anfälliger für eine Infektion mit *Candida albicans*, hatten wesentlich geringere Zahlen von Neutrophilen im peripheren Blut und konnten keine suffiziente T<sub>h1</sub>-Antwort aufbauen, was dem Fakt zuzuschreiben war, dass die IL-6<sup>-/-</sup>-Mäuse stark erhöhte IL-10-Spiegel und daraus resultierend sehr geringe Konzentrationen von IL-12p70 hatten <sup>(61)</sup>.

Eine wesentliche Rolle scheint IL-6 in der frühen Phase der Infektion vor allem dadurch zu spielen, dass es einen schnellen Konzentrationsanstieg von IFN- $\gamma$  induziert, der über die Aktivierung von Phagozyten die Ausbreitung der Erreger limitiert, bis eine effektive zelluläre Immunität gegen diese aufgebaut ist. Gleichwohl ist die rasche IL-6-Produktion von Wildtypmäusen bei weniger virulenten bzw. sich langsamer ausbreitenden Keimen wie *Mycobacterium tuberculosis* im Vergleich zu IL-6<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Vorteil im Überleben und der Ausbildung von pathogenspezifischer Immunität <sup>(64)</sup>.

Neben den proinflammatorischen Eigenschaften besitzt IL-6 einige weitere immunmodulatorische Fähigkeiten. So wirkt es über die Verstärkung der Glukokortikoid-Synthese, durch die Inhibition der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Expression <sup>(65,96)</sup>

und die Stimulation der Expression von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-1-Rezeptor-Antagonisten und löslichen TNF-Rezeptoren <sup>(89)</sup> auch potent antiinflammatorisch.

Außerdem führen erhöhte Spiegel von IL-6 zur Ausschüttung des stark immunsuppressiven Prostaglandin E<sub>2</sub> und damit zur Inhibition der T-Zell-Mitogenese sowie zur Aktivierung der IL-10-Sekretion. So ist festzustellen, dass hohe IL-6-Spiegel zu einem außerordentlichen Ungleichgewicht im Zytokinmilieu mit inhibierten proinflammatorischen, jedoch aktivierten antiinflammatorischen Prozessen führen. Traumata und chirurgische Eingriffe führen zur vermehrten Sekretion von IL-6, wobei das schiere Ausmaß an Gewebeschädigung eine direkte Rolle spielt. Die postoperative Immunsuppression ist durch die vorbeschriebenen Mechanismen durch erhöhte IL-6-Spiegel in diesem Sinne mitverursacht.

Nach chronischer Ingestion von Ethanol bei Mäusen produzierten Thymo- und Splenozyten deutlich weniger IL-6 <sup>(105)</sup>. Bei humanen Blutmonozyten konnte durch akute Ethanol-Exposition ebenfalls eine deutliche Verringerung der IL-6-Produktion auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden <sup>(83)</sup>. Postoperativ ging eine verringerte plasmatische IL-6/IL-10-Ratio bei alkoholabhängigen Patienten zudem mit einem gesteigerten Infektionsrisiko einher <sup>(63)</sup>.

In einer anderen Studie zeigten Patienten mit chronischem Alkoholabusus, welche posttraumatisch intensivmedizinisch betreut werden mussten, initial deutlich erhöhte plasmatische IL-6- und IL-10-Spiegel und wiesen eine Zunahme von Multiorganversagen, Sepsis und Pneumonie auf <sup>(102)</sup>.

Obgleich häufig die plasmatischen Konzentrationen und die poststimulatorische Produktion von IL-6 durch Monozyten erniedrigt waren, gibt dies kaum Aufschluss über die lokale pulmonale Situation bei einer Pneumonie. Geht man davon aus, dass eine Ethanolvorbehandlung postoperativ zu einer dysregulierten Immunantwort und im Rahmen einer Pneumonie zu erhöhter Gewebedestruktion und verminderter bakterieller Clearance führt, so ist bei diesen Tieren zumindest im Lungengewebe von einem Anstieg des IL-6 auszugehen. Abzuwarten bleibt, inwiefern sich die teils gegensätzlichen Beobachtungen in den IL-6-Konzentrationen im Milzparenchym widerspiegeln.

#### 1.8.4 Interleukin-(IL-)10

Wie bereits erwähnt, ist IL-10 ein antiinflammatorisches Zytokin, welches seine immunsuppressiven Effekte vor allem über die Inhibition der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) ausspielt. Als Hauptproduzenten von IL-10 gelten Makrophagen und T<sub>h2</sub>, es wird außerdem von zytotoxischen T-Zellen sezerniert. Es supprimiert die Aktivierung von Makrophagen, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und verhindert, dass Monozyten als akzessorische Zellen für die Stimulation von T-Zellen und NK-Zellen wirken. IL-10 ist ebenfalls für das Wachstum und die Differenzierung von B-Lymphozyten wichtig. Bei Kontakt von Bakterien mit Monozyten induzieren besonders Gram-negative eine erhöhte Produktion von IL-10 <sup>(23)</sup>.

Einem operativen Eingriff folgt zunächst eine hyperinflammatorische Phase, die für das Abtöten von infektiösen Organismen und zur Induktion der Immunabwehr wichtig ist. Zur Eingrenzung des Gewebeschadens und zur Induktion von Reparationsprozessen ist eine durch IL-10-Erhöhung gekennzeichnete antiinflammatorische, immunsupprimierte zweite Phase wichtig. Durch diese Hochregulation von IL-10 ist aber auch die Inzidenz von Infektionen am 3. postoperativen Tag besonders hoch <sup>(74,101)</sup>. Untersuchungen von Moore et al. zeigten zudem, dass IL-10 die Immunantwort durch Inhibition von phagozytotischen und bakteriziden Aktivitäten im Setting einer pulmonalen bakteriellen Entzündung herunterreguliert.

Folglich sind sehr hohe, aber auch sehr niedrige IL-10-Spiegel im Rahmen infektiöser Erkrankungen mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet <sup>(53,67,21,104)</sup>.

IL-10 verringert die Antigen-präsentierende Kapazität, die MHC-II-Expression und reguliert IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  herunter. Die gleichen Effekte wurden für die akute Applikation von Alkohol beschrieben <sup>(49,50,86,83,100)</sup>. In vitro konnte gezeigt werden, dass sowohl bei stimulierten als auch bei unstimulierten humanen Monozyten durch akuten Alkohol die IL-10-Produktion gesteigert werden konnte <sup>(39,85,84,100)</sup>. Ethanol vermag allerdings auch eine direkte Herabregulation der TNF- $\alpha$ -Produktion <sup>(39,100)</sup>.

Operativer Stress führt zur Mehrproduktion von IL-10 und damit zu einer Immunsuppression <sup>(31)</sup>. Bei alkoholkranken Patienten fanden Sander et. al. postoperativ eine erhöhte Infektionsrate, die mit einer verminderten IL-6/IL-10-Ratio unmittelbar nach der Operation verbunden war <sup>(63)</sup>. Von Heymann et al.

beobachteten unter gleichen Voraussetzungen ein häufigeres Auftreten von Multiorganversagen sowie eine Tendenz zur Entwicklung von Pneumonie und Sepsis<sup>(102)</sup>.

In Anbetracht all dessen bleibt in unserem Modell zu klären, wie sich die IL-10-Spiegel unter gleichzeitigem Einfluss von präoperativer Alkoholvorbereitung und operativem Stress im Rahmen der postoperativen Pneumonie ändern. Es ist ein Synergismus dieser Faktoren und somit eine Zunahme der IL-10-Konzentrationen in Lunge und Milz anzunehmen.

### 1.8.5 Interleukin-(IL)-4

IL-4 wurde zum ersten Mal 1982 von Howard, M. et al. als B-Zell-stimulierender Faktor beschrieben, welcher sowohl die B-Zell-Aktivierung als auch die B-Zell-Proliferation anregt. Seitdem wurden eine ganze Reihe von Funktionen beschrieben, die IL-4 trägt, inklusive der Modulation von Makrophagenfunktionen und der T-Zell-Differenzierung.

IL-4 induziert die Differenzierung von unreifen T-Helferzellen zu  $T_{H2}$ -Lymphozyten und ist in die Chemotaxis eingebunden. Wie auch IL-10 inhibiert IL-4 die Aktivierung von Makrophagen<sup>(32)</sup>, die makrophagen-aktivierenden Effekte von  $IFN-\gamma$  sowie die Produktion von  $T_{H1}$ -Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6<sup>(88)</sup>, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen.

Dass IL-4 für die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort essentiell ist, zeigten IL-4-k.o-Mäuse, die im Rahmen einer Pneumonie mit einer stark dysregulierten proinflammatorischen Zytokinproduktion reagierten. Dabei traten starke Konzentrationserhöhungen des TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 auf und waren mit signifikant erhöhter postinfektiöser Letalität assoziiert<sup>(52)</sup>. In Versuchen, bei denen im Mausmodell intranasal IL-4 vor einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) appliziert wurde, zeigte sich eine verringerte postinfektiöse Letalität und erhöhte bakterielle Clearance<sup>(26)</sup>.

Chronische Alkoholgabe und operativer Stress führten für sich genommen zu einem Shift der  $T_{H1}/T_{H2}$ -Antwort in Richtung  $T_{H2}$ <sup>(33,43,103)</sup>. Neben IL-10 gilt IL-4 als eines der wichtigsten Zytokine, welche vom  $T_{H2}$ -Subset produziert werden, es stabilisiert die Differenzierung zu  $T_{H2}$ -Zellen.

Chronische Ethanolbelastung führte bei murinen Spleno- und Thymozyten zur Verringerung der IL-4-Produktion <sup>(105)</sup>. T-Lymphozyten zeigten dem entgegen nach chronischer Alkoholbehandlung eine höhere IL-4-Produktion <sup>(71)</sup>.

Zu den posttraumatischen Auswirkungen auf die Veränderungen von IL-4 in Verbindung mit Alkohol gibt es nur wenig publizierte Studien. Messingham et al. konnten zeigen, dass die einmalige Ethanol-Injektion bei Mäusen vor einem Verbrennungstrauma posttraumatisch zu einer stark verminderten IL-4 Produktion von Lymphozyten führt. Gleichzeitig führte diese Konzentrationsverringerung zu einem deutlichen Anstieg des von Makrophagen produzierten IL-6 <sup>(45)</sup>. Bei jungen Männern kam es posttraumatisch zu einer Herabregulation der Zytokin-Syntheseleistung von Monozyten. Gleichfalls war im Sinne einer Aktivierung der T<sub>h2</sub>-Subpopulation eine vermehrte IL-4-Produktion von CD<sup>4+</sup> T-Lymphozyten zu verzeichnen. Eine wesentliche Alteration in der Produktion von TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  durch T-Lymphozyten konnte nicht festgestellt werden <sup>(80)</sup>.

Aufgrund der Datenlage ist postoperativ im Rahmen der Pneumonie eine Erhöhung der IL-4-Spiegel zu erwarten. In Kombination mit der präoperativen Vorbehandlung mit Ethanol sollte sich zudem ein additiver Effekt zeigen.

## 1.9 Zielsetzungen

Wie bereits beschrieben wurde, resultieren aus regelmäßigem Alkoholkonsum eine Reihe von Veränderungen des Immunsystems. Diese haben einen maßgeblichen Einfluss auf den postoperativen Verlauf bei den betroffenen Patienten. Die postoperative Pneumonie ist als häufigste postoperative Komplikation bei intensivmedizinisch zu betreuenden Alkoholikern zu nennen.

Eintrittspforte und primärer Ort der Infektion ist die Lunge. Durch den Alkoholkonsum sind weite Teile des Immunsystems verändert, auch die an der Immunreaktion mitbeteiligten Organe wie die Milz. Zudem ist bekannt, dass neben den immunmodulatorischen Folgen des Alkoholkonsums operativer Stress immunsuppressive Wirkungen hat.

Primäre Zielsetzung dieser Arbeit ist, die Veränderungen des Immunsystems während einer postoperativen Pneumonie durch eine 8tägige Alkoholvorbehandlung anhand ausgewählter Zytokine zu überprüfen. Um auch die systemischen Auswirkungen teilweise zu erfassen, erfolgt die Messung der Interleukine nicht nur lokal im Lungenparenchym, sondern ebenfalls im Milzparenchym. Die Milz als lymphoretikuläres Organ ist durch die Ethanol-Vorbehandlung ebenfalls beeinflusst worden. Es erscheint somit sinnvoll, die immunologischen Auswirkungen auch in der Milz als in den Blutkreislauf eingeschaltetes Immunorgan zu untersuchen.

Bezüglich der primären Zielsetzung wird folgende Hypothese formuliert:

Eine 8-tägige präoperative Vorbehandlung mit Ethanol führt im Rahmen einer postoperativen Pneumonie durch eine Immunsuppression zu einer pathologischen Veränderung der Zytokinspiegel in Milz und Lunge, was mit einem aggravierten Pneumonieverlauf korreliert.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Kommt es unter der Ethanol-Vorbehandlung und im Rahmen der postoperativen Pneumonie zu:
  - a. einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 im Lungen- und Milzparenchym?
  - b. einer Erhöhung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 im Lungen- und Milzparenchym?

2. Führt die präoperative Ethanolapplikation im Vergleich zur Vorbehandlung mit NaCl bereits zu einer anhand der Zytokinbestimmungen erkennbaren veränderten postoperativen Immunreaktivität?

Die sekundäre Zielsetzung dieser Arbeit ist, das benutzte Tiermodell als klinisch relevantes, operatives Modell zur Evaluierung der spezifischen Immunreaktivität des Lungen- und Milzparenchyms zu etablieren.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

3. Lassen sich anhand des histologischen Bildmaterials der mit Klebsiellen infizierten Tiere Unterschiede zwischen der Vorbehandlung mit Ethanol und NaCl erkennen?
4. Führt die Ethanolvorbehandlung in der Milz als Kompartiment der systemischen Abwehr zu vergleichbaren Veränderungen wie im Lungenparenchym als primären Ort der Infektion?



## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 *Materialien*

#### 2.1.1 Substanzen für mikrobiologische Untersuchungen

Schaedler Anaerobe Broth	Oxoid
Glyzerin	Sigma
Columbia-Agarbasis	Oxoid
5% Schafsblut	Oxoid
3%D+-Glucose	Fluka
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Care Roth GmbH&Co.
PBS	Dulbecco, Biochrom AG
Cell Strainer (70µm), Falcon	Becton Dickonson Labware
Tube 50 ml	Sarstedt
5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Becton Dickonson Labware
Cryovials	Nunc
Safe-lock Eppendorf Tubes	Eppendorf
Neo Lab Beutel, 10x15 cm, steril für Blender Stomacher 80 ml	neo Lab
Einmal-Impfösen, steril	VWR International
Drigaltzki-Spatel	
15 ml Centrifuge Tubes with Screw Caps, steril	Roth, Carl

#### 2.1.2 Substanzen und Materialien für Behandlung der Tiere

Waage	ScalTec
Panthenol-Augensalbe	Jenapharm
Narkosegerät Sulla 800V, Vapor 19.3	Draeger
Isofluran	Forene, Fa Abbot
Alkohol	Alkoholkonzentrat 95%, Braun
NaCl 0,9%	Braun
Ketamin	Ketamin (10mg/ml), DeltaSelect
Midazolam	Dormicum, Roche
Glucose 5%	Braun

Käfige	Makrolon, IVC TypII lang
Futter	Standardtrockenfutter (sniff M Z extrudiert)
Nahtmaterial	Ethicon, Johnsson&Johnsson
Sprühpflaster	Band Aid, Johnsson&Johnsson
Rasierer	Wilkinson

### 2.1.3 Substanzen für Organlysepuffer

CHAPS	SERVA Electrophoresis Products
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
EDTA	SIGMA
PBS	Dulbecco, Biochrom AG
Complete Protease Inhibitor	Fa Roche

### 2.1.4 Standardgeräte für laboranalytisches Arbeiten

Stomacher	
Plattenschüttler	S410, MLW
Vortexgerät	VF2 Janke&Kunkel
Plattenlesegerät	MR5000, Dynatech

## 2.2 *Methoden*

### 2.2.1 Versuchstiere

Es handelte sich um 8 bis 12 Wochen alte, weibliche, spezifisch pathogenfreie (SPF) Balb/c-Mäuse. Diese wurden von der Zuchtstation Harlan Winkelmann, Deutschland bezogen.

Nach der Anlieferung wurden die Balb/c-Mäuse 1 Woche zur Adaptation in Gruppen zu maximal je 9 Tieren auf Makrolon-Käfige verteilt. Sie wurden tierschutzgerecht in

einem klimatisierten Raum (Temperatur 27°C (25±2)°C ), relativer Luftfeuchte 52 % (55±5%), mit kontinuierlichem Licht / Dunkel-Wechsel (12 stündlich), Standardtrockenfutter und Wasser ad libitum und in SPF-Käfigen gehalten.

Balb/c-Mäuse wurden sowohl für Infektionsmodelle als auch für alkoholtoxische und operative Versuche <sup>(16,66,29)</sup> vielfach verwendet.

## 2.2.2 Ausschlusskriterien

Tiere, die während der Behandlung verstarben, die das Alter von 12 Wochen überschritten oder schon vor dem 1. Behandlungstag ein zu hohes Körpergewicht (>23g) hatten, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Gleiches trifft auf Tiere zu, die bereits vor Behandlungsbeginn bei Erhebung des klinischen Scores Piloerektion des Fells, Sekretion aus Nase, After oder Augen oder starke motorische Verlangsamung aufwiesen.

## 2.2.3 Aufschlüsselung der Gruppenbezeichnungen

**Tabelle 1:**  
Darstellung der gruppenspezifischen Verfahrensweise

	1. bis 7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag
<b>NaCl+ Sham-Infekt.</b>	NaCl i.p., Erhebung des klinischen Scores	NaCl i.p., Erhebung des klinischen Scores, mediane Laparatomie	Erhebung des klin. Scores	Erhebung des klin. Scores, NaCl Applikation intranasal	Erhebung des klin. Scores, Tötung, Präparation
<b>EtOH+ Sham-Infekt</b>	EtOH i.p., Erhebung des klinischen Scores	EtOH i.p., Erhebung des klinischen Scores, mediane Laparatomie	Erhebung des klin. Scores	Erhebung des klin. Scores, NaCl Applikation intranasal	Erhebung des klin. Scores, Tötung, Präparation
<b>NaCl+ Klebs.</b>	NaCl i.p., Erhebung des klinischen Scores	NaCl i.p., Erhebung des klinischen Scores, mediane Laparatomie	Erhebung des klin. Scores	Erhebung des klin. Scores, Klebsiellen Applikation intranasal	Erhebung des klin. Scores, Tötung, Präparation
<b>EtOH+ Klebs.</b>	EtOH i.p., Erhebung des klinischen Scores	EtOH i.p., Erhebung des klinischen Scores, mediane Laparatomie	Erhebung des klin. Scores	Erhebung des klin. Scores, Klebsiellen Applikation intranasal	Erhebung des klin. Scores, Tötung, Präparation

#### **2.2.4 Gruppenentsprechende Vorbehandlung der Tiere**

In diesem Modell erfolgte die Ethanolapplikation intraperitoneal, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen. Dies hat im Vergleich zu Ethanol-Diät-Modellen den Vorteil, eine spezifisch auf das Körpergewicht angepasste Menge Ethanol zu verabreichen<sup>(20)</sup>. Da frühe alkoholbezogene Organschäden in Form von Steatosis hepatis, Entzündungszeichen und fokalen hepatischen Nekrosen erst nach ca. 4 Wochen Ethanolapplikation auftreten<sup>(95)</sup>, sind nach 8 Tagen Ethanolapplikation zwar immunologische Veränderungen zu erwarten, erwähnte Organschäden jedoch weitestgehend ausgeschlossen.

Es erfolgte die intraperitoneale Verabreichung von Alkohol (3,8 g Alkohol/kg Körpergewicht in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) bei Tieren der Gruppen EtOH+Shaminfektion und EtOH+Klebsiellen, und von 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung bei Tieren der Gruppen NaCl+Shaminfektion und NaCl+Klebsiellen an 8 aufeinander folgenden Tagen unter einer keimarmen Arbeitsbank (Heraeus, LaminAir HBB 2448).

#### **2.2.5 Mediane Laparotomie unter Isofluran-Narkose**

Die Versuchstiere wurden am 8. Behandlungstag einer medianen Laparotomie unterzogen (siehe Tabelle 1).

Die Einleitung der Narkose erfolgte für 10-15 Sekunden bei 0,8 l/min O<sub>2</sub> und 3-4% Isofluran über eine Maske, welche der abgetrennte vordere Teil einer 20 ml-Spritze war. Das Unterhalten der gewünschten Narkosetiefe wurde durch 1,8 – 2,5% Isofluran bei 0,8l / min O<sub>2</sub> erreicht.

Das Feststellen der Narkosetiefe nach Einleitung erfolgte anhand der Prüfung des Zwischenzehenreflexes. Das Tier wurde nach Erreichen der erwünschten Narkosetiefe auf einem 38° C temperierten Wärmekissen zur Vermeidung einer Hypothermie mittels Klebestreifen an den Extremitäten in Rückenlage fixiert. Danach wurde das Abdomen mittels Einmalrasierer rasiert und anschließend desinfiziert. Nach Abdeckung mit einem sterilen Tuch wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, bei der zuerst ein ca. 1 cm langer Hautschnitt erfolgte, bevor ebenfalls das Peritoneum mit einem ca. 1 cm großen Schnitt eröffnet wurde. Es folgte die Mobilisation des linken Leberlappens mit anschließender Peritonealnaht als

fortlaufende Naht. Die Hautnaht erfolgte in Einzelknopfheften, danach schloss sich die Wundversorgung mittels Sprühverband an.

Diese Art der Operation zeigte sich in der Erlernung und Handhabung einfach und bedingt dadurch eine gute Standardisierbarkeit. Auch kam dieser operative Zugang bereits in anderen Forschungsgruppen zum Einsatz <sup>(29,109)</sup>.

Das Trinkwasser wurde durch eine 5%ige Glucose-Lösung zur Vermeidung einer metabolischen Entgleisung ersetzt, wie das auch von anderen Arbeitsgruppen praktiziert wurde <sup>(29)</sup>.

## 2.2.6 Erhebung des klinischen Scores und der Gewichtsveränderungen

Die Erhebung des klinischen Scores erfolgt anhand von 3 verschiedenen Parametern. Es erfolgte eine Beurteilung

- der Piloerektion, d.h. es wurde die Struktur des Fells beurteilt;
- der Motorik, also der Koordination und Bewegungsgeschwindigkeit der Mäuse;
- der Schleimhautsekretion, wobei die Stärke eventueller Sekretion aus Nase, Augen und After beurteilt wurde;

Die Erhebung des klinischen Scores erfolgte ab dem ersten Behandlungstag. Das Gewicht der Tiere wurde am 1. und 8. Behandlungstag und an jedem postoperativen Tag dokumentiert. Die Kriterien zur Verteilung des Punktescores werden in Tabelle 2 dargestellt:

**Tabelle 2:**  
Kriterien für den klinischen Score und deren Wichtung

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

Der Gesamtscore pro Tag ergab sich aus der Addition der ermittelten Punkte pro Kriterium.

## **2.2.7 Klebsiella pneumoniae**

In dem von uns benutzten OP-Infektionsmodell verwendeten wir Klebsiellen vom Typ *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (Schroeter) Trevisan Serotype 2 von ATCC 43816, welche auch in anderen Studien für Pneumoniemodelle eingesetzt wurden<sup>(25,48)</sup>.

### **2.2.7.1 Herstellen einer Nährbouillon**

Wir gaben eine geringe Menge an aliquotierten und zur Aufbewahrung bei  $-25^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Klebsiellen zusammen mit 10 ml Schaedlerbouillon in ein 15 ml Falconröhrchen. Dieses wurde 24 Stunden auf einen Schüttler installiert, der sich in einem Brutraum ( $37^{\circ}\text{C}$ ) befand und eine Kreisbewegung von 200 Umdrehungen pro Minute ausführte.

Nach 24 Stunden Brutzeit wurden 9 ml der Schaedler-Klebsiellen-Lösung mit 1 ml Glycerin versetzt, um im folgenden Zyklus beim Einfrieren bei  $-25^{\circ}\text{C}$  und dem späteren Auftauen einen möglichst geringen Verlust von vermehrungsfähigen Klebsiellen in der Lösung zu haben. Nach Aliquotierung der hergestellten Suspension erfolgte das Einfrieren der 1 ml-Aliquots in Nunc-Kryoröhrchen bei  $-25^{\circ}\text{C}$  Grad zur Aufbewahrung.

### **2.2.7.2 Feststellung des Klebsiellentiters im Aliquot**

Die zur Infektion der Mäuse benötigten Klebsiellen (Typ *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (Schroeter) Trevisan Serotype 2 von ATCC 43816) wurden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  im Robert-Koch-Institut sowohl als mit 1/10 Glycerin versetzte Aliquots (Keimzahl ca.  $10^9\text{CFU/ml}$ ) als auch in der Stammsammlung der AG Prof. Dr. Appel aufbewahrt.

Für die Keimzahlbestimmung der eingefrorenen Aliquots wurde exemplarisch eines aufgetaut und 0,5 ml Klebsiellenlösung in einer 1:10 Verdünnungsreihe mit 0,5%iger NaCl-Lösung auf Columbia-Dextrose(5%)-Blutagar ausplattiert. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgten das Auszählen der Kolonien und das

anschließende Berechnen der Keimkonzentration mit Hilfe der Formel des gewogenen arithmetischen Mittels.

### **2.2.7.3 Herstellung der Infektionslösung**

Zur Herstellung der Infektionslösung wurde eines der mit Glycerin versetzten und eingefrorenen Aliquots aufgetaut und in einer Verdünnungsreihe in jeweils 8 Stufen aufsteigend 1:10 verdünnt. Anhand der vorher ermittelten Konzentration von Klebsiellen (CFU/ml) in der Klebsiellen-Glycerin-Boullion wurde bestimmt, welche Verdünnungsstufe dazu geeignet ist, die Infektionslösung herzustellen. Es wurde zum Infizieren der Tiere diejenige Verdünnungsstufe benutzt, die eine Konzentration von  $2 \times 10^5/1\text{ml}$  besaß, dies entspricht einer Konzentration von  $10^4/50\mu\text{l}$  CFU *Klebsiella pneumoniae*.

### **2.2.8 Infektion und Shaminfektion**

Es erfolgte die Betäubung der Tiere mit einem Gemisch aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Midazolam (4 mg/kg Körpergewicht). Dies gewährleistete eine gleichmäßige und tiefe Atmung als Voraussetzung für die bestmögliche Aspiration der Tiere.

Nach gewünschter Narkosetiefe, welche anhand der Atemfrequenz und der Reflexe geprüft wurde, erfolgte die gruppenspezifische Behandlung der Tiere.

Den Tieren der Gruppen NaCl+Klebsiellen sowie EtOH+Klebsiellen wurde jeweils mit einer Pipette  $10^4$  CFU *Klebsiella pneumoniae* in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  isotoner NaCl-Lösung langsam über einen Zeitraum von 3-5 Minuten nasal appliziert.

Den Tieren der Gruppen NaCl+Shaminfektion sowie EtOH+Shaminfektion wurde über einen Zeitraum von 3-5 Minuten mittels einer Pipette 50  $\mu\text{l}$  isotone NaCl-Lösung intranasal verabreicht. Sämtlich beschriebene Schritte erfolgten unter einer keimarmen Arbeitsbank (Heraeus, LaminAir HBB 2448).

## **2.2.9 Tötung und Präparation der Tiere**

### **2.2.9.1 Blutentnahme und Tötung**

Am 11. Tag, also dem 3. postoperativen Tag (24 Stunden nach Infektion mit *K. pneumoniae* bzw. Shaminfektion), erfolgte die Tötung und Präparation der Tiere.

Nach der intraperitonealen Applikation eines Gemisches von Ketamin (250 mg/kg KG) und Midazolam (10 mg/kg KG) kam es zum Einsetzen der Bewusstlosigkeit bei den Tieren. Es erfolgte dann die retrobulbäre Blutentnahme mittels mit Na-Heparin versetzter Haematokrit-Kapillaren, womit der retrobulbäre Venenplexus eröffnet wurde. Das Auffangen des Blutes erfolgte mit Monovetten, welche vorher mit 0,1 ml Liquemin versetzt worden waren. Die gewonnene Blutmenge befand sich im Bereich von 0,3 - 0,5 ml.

Nach erfolgter Blutentnahme erfolgte der Genickbruch, die Prüfung des erfolgreich durchgeführten Genickbruches geschah durch den Versuch, den Zwischenzehenreflex auszulösen.

### **2.2.9.2 Präparation der Organe**

Die getöteten Tiere wurden mittels Kanülen auf einer mit Alufolie bespannten Korkplatte fixiert und anschließend desinfiziert.

Die Präparation erfolgte unter keimarmer Arbeitsbank. Das Durchtrennen der Haut geschah median vom Os pubis bis zur Mandibula, danach wurde die Haut vom Peritoneum abgetrennt.

Es folgte die Eröffnung des Peritoneums median bis zum Diaphragma. Nun wurden die Milz und die Leber freipräpariert, entnommen und in jeweils ein steriles, verschraubbares Röhrchen verbracht, welche anschließend sofort durch Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Lagerung bei -80°C in Trockeneis aufbewahrt wurden. Durch den Einstich in das Zwerchfell beim Herzschatten (Pars cardiaca diaphragmae) kam es zu einem Druckausgleich im Thorax mit anschließendem Kollabieren der Lungen.

Das Diaphragma, das Sternum und Teile des Rippenbogens wurden entfernt, zusätzlich war das Durchtrennen der Claviculae nötig. Es schloss sich das Freilegen



der Trachea durch Entfernung der Speicheldrüsen sowie von umgebendem Fett-, Binde- und Muskelgewebe im Halsbereich an.

Zur Durchführung einer bronchoalveolären Lavage erfolgte das Einführen einer 18 G-Flexüle mit Fixierung oberhalb der Carina bronchialis. Die bronchoalveoläre Lavage erfolgte mit 11 ml 4°C kaltem PBS.

Nach Durchführung der BAL erfolgte die Entnahme der Lunge sowie des Thymus, wobei diese Organe analog zu Milz und Leber ebenfalls schockgefroren und bis zur Lagerung im -80°C-Tiefkühlfach in Trockeneis aufbewahrt wurden.

## **2.2.10 Feststellung der Infektionsdosis im Tier**

### **2.2.10.1 Mikrobiologische Untersuchung der Lungen**

Die nicht lavagierten Lungen wurden keimfrei entnommen und auf zerstoßenem Eis in sterilen 50 ml-Falconröhrchen transportiert. Innerhalb der folgenden 2 Stunden erfolgte die Aufarbeitung. Die Lunge wurde in einem Stomacherbeutel gewogen, steril zerkleinert und in einer 1:10 Verdünnung mit PBS gemischt. Danach wurden die im Lungengewebe vorhandenen Klebsiellen 1 Minute durch die Bewegung der Stomacherpedale aus dem Gewebe entfernt. Jeweils 0,9 ml PBS wurden in 8 Safe-lock-Eppendorf Tubes pipettiert. Anschließend wurden 0,1 ml der Klebsiellenlösung aus dem Stomacherbeutel hinzugegeben und eine lineare 1:10 Verdünnungsreihe erstellt. Je 100 µl wurden auf 2 Columbia-Dextrose(5%)-Blutagarplatten gegeben, 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet und dann die Keimzahl durch Auszählung der Kolonien und Berechnung anhand der Formel des gewogenen arithmetischen Mittels bestimmt.

### **2.2.10.2 Mikrobiologische Untersuchung des Blutes**

Zur mikrobiologischen Untersuchung wurde das unmittelbar vor Tötung der Tiere entnommene Blut benutzt. Dieses wurde in sterilen verschließbaren Röhrchen auf Eis transportiert und innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet. Für den Nachweis einer Bakteriämie wurden 10 µl und 100 µl Blut auf je einer Columbiablut-Dextrose(5%)-Platten ausplattiert und danach wurden 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der Kolonien und die Berechnung der Keimkonzentration anhand der Formel für das gewogene arithmetische Mittel.

Formel für das gewogene arithmetische Mittel:

$$C = \frac{\sum c}{n1 \times 1 + n2 \times 0,1} \times d, \text{ mit}$$

C Anzahl der koloniebildenden Einheiten je ml Probe

$\sum c$  Summe der Kolonien aller Agarplatten, die zur Auswertung kamen

n1 Anzahl der Agarplatten mit der niedrigsten Verdünnungsstufe

n2 Anzahl der Agarplatten mit der nächsthöheren ausgewerteten Verdünnungsstufe

d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (bezogen auf n1)

### 2.2.11 Alkoholkonzentrationsbestimmung

Die Feststellung des Alkoholgehaltes des Blutes der Mäuse geschah per gaschromatographischer Bestimmung der Blutproben mittels Headspace-Methode. 100 µl Blut wurde in eine Headspace-Probeflasche gegeben. Die Probeflaschen wurden in den Autosampler installiert und es erfolgte die gaschromatographische Untersuchung mit Dreifachbestimmung jeder Probe.

### 2.2.12 Herstellung von Organhomolysaten mit Abtrennung der Membranfraktion

Der erste Schritt zur Homolysierung der Organe verlangte die Pulverisierung der bei -80°C eingefrorenen Organe mit Mörser und Pistill in Flüssigstickstoff (IN<sub>2</sub>). Das daraus gewonnene gefrorene Pulver wurde in 5 ml Puffer (1xPBS, 1mM EDTA, 0,5% v/v Tween 20, 0,25% w/v CHAPS, Complete Proteaseinhibitor Cocktail Tablet (Roche)) aufgelöst und anschließend 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Lösung für 15 Minuten bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert. Das bei diesem Zentrifugationsschritt entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand zwecks

des Abtrennens der Membranfraktion von den solubilisierten Proteinen für 55 Minuten bei 18000 x g ultrazentrifugiert. Der daraus wiederum gewonnene Überstand wurde nachfolgend aliquotiert und bei -80°C eingefroren, das Pellet verworfen.

### **2.2.13 Messung der Protein- und Zytokinkonzentrationen der aliquotierten Überstände**

Zur Vermeidung eventueller Matrixeffekte beim Messen der Zytokinkonzentrationen per ELISA wurden die Proteinlösungen mit PBS derart verdünnt, dass die resultierende Probe eine Proteinkonzentration im Bereich von 0,2 - 1,2 mg Protein/ml aufwies. Die Kontrolle der Proteinkonzentration erfolgte durch indirekte kolorimetrische Bestimmung mittels eines kommerziell erhältlichen BCA-Kits (Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA).

Die Bestimmung der Zytokine in den aliquotierten und, wie vorher beschrieben, verdünnten Überständen erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (Quantikine, RnD Systems). Die durch das Plattenlesegerät (Dynatech MR5000) ermittelten Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden anhand ihrer vorher bestimmten Proteinkonzentrationen nun normiert und in pg / mg Protein angegeben.

### **2.2.14 Messen der Interleukin 1 $\beta$ -Konzentrationen**

Nachfolgend wird exemplarisch die Prozedur zur Bestimmung von IL-1 $\beta$  in den Organlysatüberständen beschrieben. Diese Beschreibung gilt analog auch für die Bestimmung der Zytokine IL-4, IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$ .

Zur quantitativen Bestimmung der IL1 $\beta$ -Konzentrationen sowie auch der anderen Zytokine in den aliquotierten Organhomolysatüberstände wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits (Quantikine, Firma R&D Systems) benutzt. Die Bestimmung erfolgt in diesen Kits indirekt kolorimetrisch.

Zuerst wurden die im Kühlschrank gelagerten ELISA-Kits auf Zimmertemperatur gebracht, ebenso die zu messenden Proben. Es wurde das Lyophilisat der Kit-Kontrolle mit 1 ml destillierten Wassers aufgelöst, anschließend wurde, indem man 5 ml der Kalibratorlösung dem Standard-Lyophilisat hinzufügte, eine Standardlösung der Konzentration 500 pg IL1 $\beta$ /ml erzeugt. Dabei war darauf zu achten, dass sich die

Lyophilisate vollständig auflösen. Die Herstellung der 8 Standard-IL-1 $\beta$ -Lösungen erfolgte per Verdünnungsreihe.

Die zu messenden Proben wurden - wie in 2.2.13 beschrieben - entsprechend verdünnt. In jedes der zu benutzenden Wells der Mikrotiterplatte wurde 50  $\mu$ l Assay Diluent hinein pipettiert, anschließend wurden 50  $\mu$ l aller 8 Standards der Konzentrationen 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 und 0 pg IL-1 $\beta$ /ml, jede zu messende Probe und die Kit-Kontrolle, die den Aufschluss über richtige Funktionsweise und Bedienung des Kits und seiner Komponenten gab, jeweils in Doppelbestimmung, und nach vorheriger 20-sekündiger Homogenisierung mit einem Vortexgerät, in die Wells der Mikrotiterplatte hinein pipettiert. Nach Beendigung dieses Schrittes wurde die Platte 5 Minuten auf einen Plattenschüttler gestellt, um eine optimale Verteilung von Proben, Standards und der Kit-Kontrolle in den einzelnen Wells zu gewährleisten. Zur Bindung des in Lösung befindlichen IL-1 $\beta$  an die mit Antikörper beschichteten Böden der Wells wurde die Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der 2 Stunden wurde jedes einzelne Well der Mikrotiterplatte mit der im Kit enthaltenen Waschpufferlösung 4-mal ausgewaschen, um die nicht an den mit dem IL-1 $\beta$ -Antikörper beschichteten Boden angedockten und in Lösung befindlichen IL-1 $\beta$ -Moleküle und andere Proteine zu entfernen. Danach erfolgte das Trocknen der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur.

Folgend wurde das IL-1 $\beta$ -Konjugat, welches mit Peroxidaseenzym beladene polyklonale IL-1 $\beta$ -Antikörper enthielt, in der Menge von 100  $\mu$ l pro Well hinzupipettiert. Wieder erfolgte die Platzierung auf dem Plattenschüttler für 5 Minuten, auf die eine weitere 2-stündige Inkubation folgte.

Nach Ablauf dieser 2 Stunden wurde die Platte wie beschrieben gewaschen. Nach vollständiger Trocknung wurde jedem Well 100  $\mu$ l Substratlösung (Kolorreagenz) hinzugefügt. Nach Ablauf einer halben Stunde Inkubation bei völliger Dunkelheit wurde die im Kit enthaltene Stop-Lösung in der Menge von 100  $\mu$ l pro Well in die Mikrotiterplatte hinzupipettiert, was zu einem Farbumschlag der durch das Kolorreagenz entstandenen blauen Färbung zu gelb führte.

Als abschließender Schritt erfolgte nun innerhalb von 30 Minuten die absorptionsphotometrische Messung mit dem Plattenlesegerät (Dynatech MR5000) bei 450 nm. Wie der Kit-Beschreibung zu entnehmen, sind alle gemessenen Probenkonzentrationen über 3.0 pg/ml als valide zu betrachten.

Um schlussendlich normierte Konzentrationen der einzelnen Organüberstände zu bekommen, wurden alle durch das Plattenlesegerät ermittelten Konzentrationen mit der gemessenen Proteinkonzentrationen so verrechnet, dass sich alle Ergebnisse auf 1mg Protein / ml Probenflüssigkeit der einzelnen verdünnten Probe beziehen.

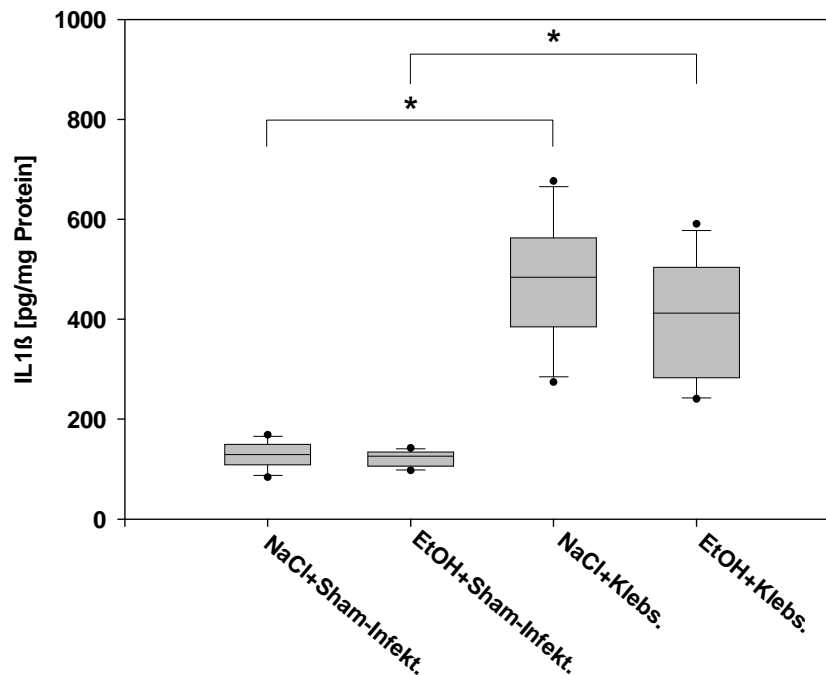
### **2.2.15 Auswertung der gewonnenen Daten**

Die Auswertung der per ELISA gewonnenen Zytokinkonzentrationen, sowie aller anderen erhobenen Daten und die statistischen Berechnungen erfolgte mit SPSS 14.0, die graphische Darstellung mit SigmaPlot 2001.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Interleukinmessungen

##### 3.1.1 IL-1 $\beta$ in der Milz



**Abbildung 1:**

Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 3:**

Mediane der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Anzahl der Tiere und Angabe der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere
NaCl+Sham-Infekt.	128,82	7
EtOH+Sham-Infekt.	126,03	7
NaCl+Klebsiellen	484,00	6
EtOH+Klebsiellen	412,42	7

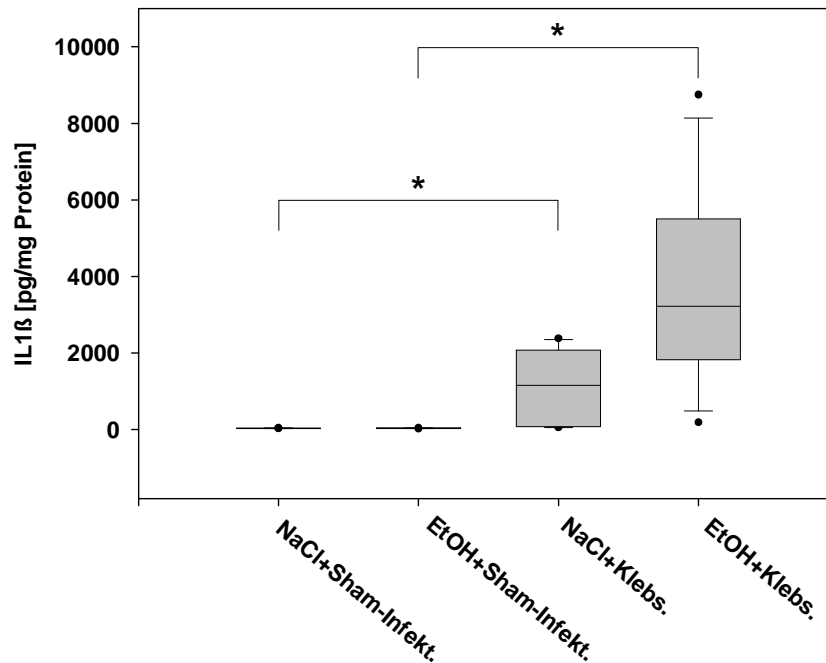
Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt. vs EtOH+Sham-Infekt.	0,428
NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,317
NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,003
EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,002

Die IL-1 $\beta$ -Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-

Whitney-U-Tests errechnet, ein  $p$  kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 1.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, stiegen die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Milzen beider Klebsiellengruppen deutlich und signifikant im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen an (siehe auch Tabelle 3). Des Weiteren konnte kein allein durch Alkohol verursachter Unterschied in den Sham- und Klebsiellengruppen gesehen werden.

### 3.1.2 IL-1 $\beta$ in der Lunge



**Abbildung 2:**

Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 4:**

Mediane der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

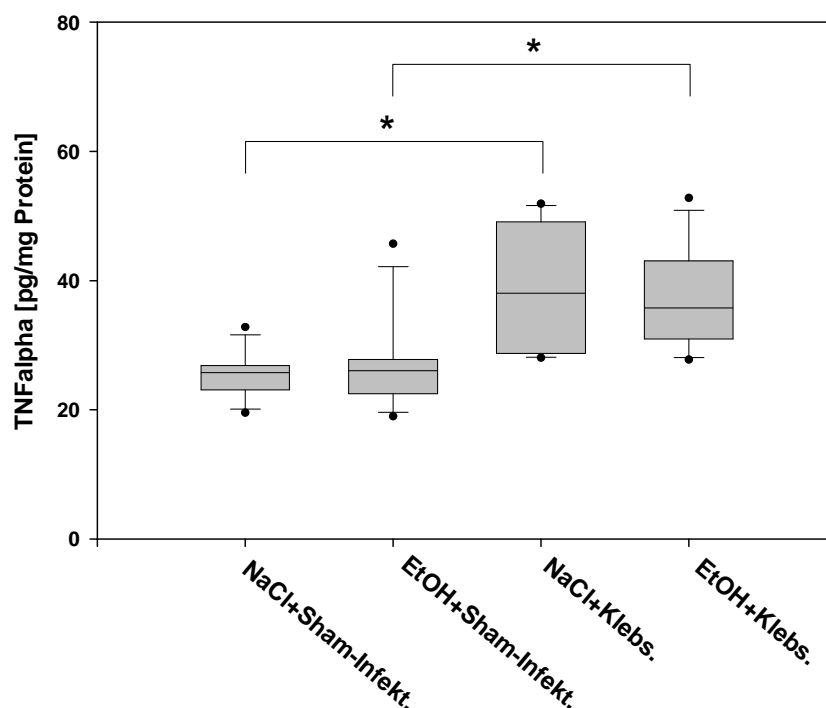
Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	35,04	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,749
EtOH+Sham-Infekt.	34,64	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,063
NaCl+Klebsiellen	1153,36	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,003
EtOH+Klebsiellen	3218,97	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,002

Die IL-1 $\beta$ -Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Lungenlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 2.



Wie in Abbildung 2 veranschaulicht, wurde in der Lunge eine stark erhöhte Konzentration von IL-1 $\beta$  bei den beiden Klebsiellengruppen im Vergleich zu den Shaminfektionsgruppen (Tabelle 4) gefunden. Ein Unterschied innerhalb der beiden Klebsiellengruppen bestand nur tendenziell in einer Erhöhung der Konzentration von IL-1 $\beta$  bei der EtOH+Klebsiellengruppe. Auch in den Vergleichen NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen und NaCl+Shaminfekt. vs. EtOH+Shaminfekt. zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.3 TNF- $\alpha$ in der Milz



**Abbildung 3**  
Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 5**

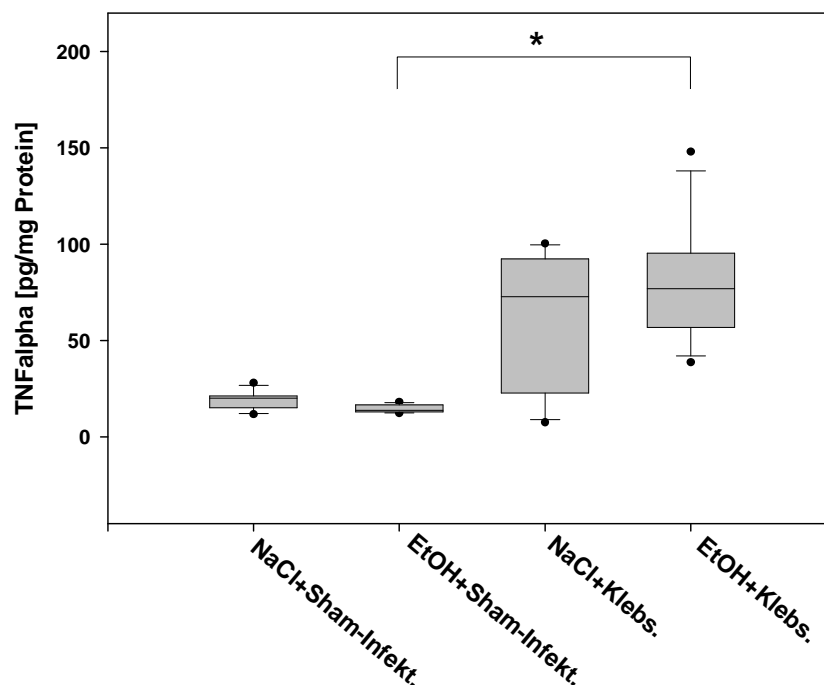
Mediane der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	25,75	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,848
EtOH+Sham-Infekt.	26,06	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	1,000
NaCl+Klebsiellen	38,04	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,010
EtOH+Klebsiellen	35,78	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,025

Die TNF- $\alpha$ -Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 3.

Der Abbildung 3 ist zu entnehmen, dass die TNF- $\alpha$ -Werte der Milzlysate bei den Klebsiellentieren signifikant höhere Level erreichen, als dies bei den jeweiligen Sham-Infektionsgruppen der Fall ist. Dies ist auch in der Tabelle 5 bei den Vergleichen von NaCl+Klebsiellen vs. NaCl+Shaminfektion und EtOH+Klebsiellen vs. EtOH+Shaminfektion nachzuvollziehen.

### 3.1.4 TNF- $\alpha$ in der Lunge



**Abbildung 4**

Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 6**

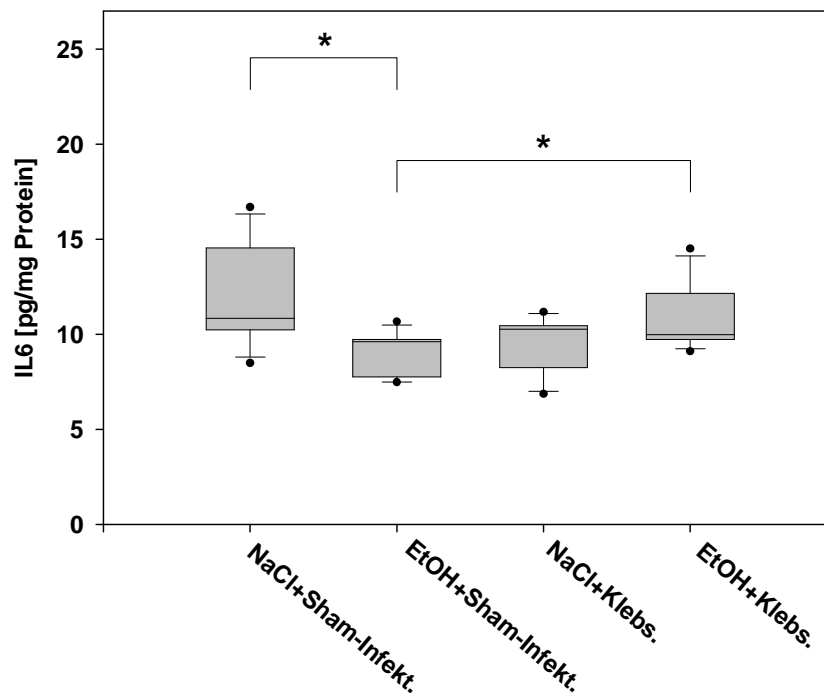
Mediane der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	20,05	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,085
EtOH+Sham-Infekt.	13,77	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,668
NaCl+Klebsiellen	72,74	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,063
EtOH+Klebsiellen	76,94	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,002

Die TNF- $\alpha$ -Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Lungenlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 4.

Ähnlich zu den Beobachtungen bei den Klebsiellen-Tieren in der Milz, stellt sich auch bei den Lungenlysaten eine Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Werte bei der EtOH+Klebsiellen-Gruppe verglichen mit der EtOH+Shaminfektions-Gruppe signifikant dar. In dem Vergleich zwischen den Gruppen NaCl+Klebsiellen und NaCl+Shaminfektion lässt sich allerdings nur eine tendenzielle Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Werte der NaCl+Klebsiellen-Tiere verglichen mit den Shaminfektionstieren feststellen.

### 3.1.5 IL-6 in der Milz



**Abbildung 5:**  
Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 7**

Mediane der IL-6-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

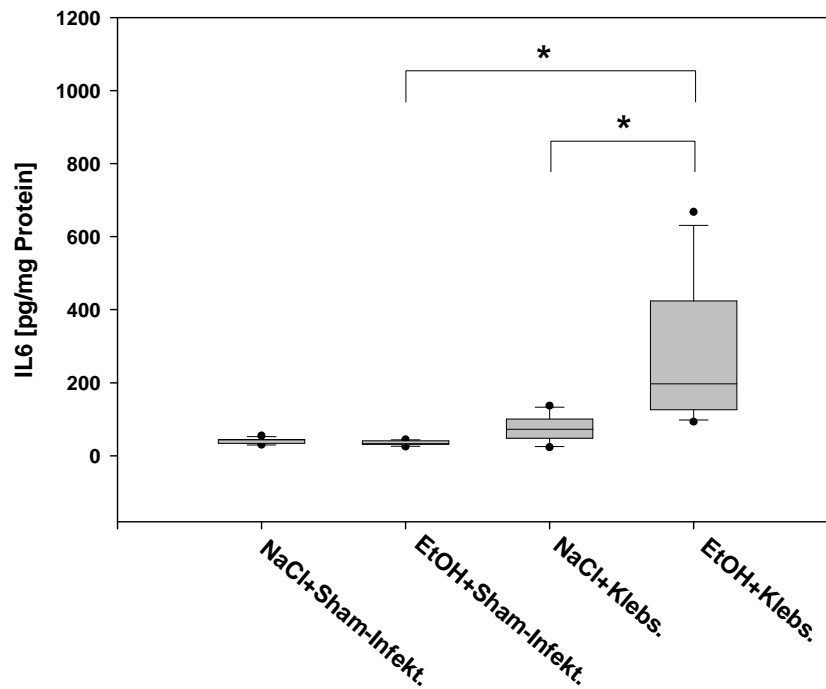
Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	10,84	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,018
EtOH+Sham-Infekt.	9,60	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,568
NaCl+Klebsiellen	10,26	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,086
EtOH+Klebsiellen	9,98	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,048

Die IL-6-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 5.

Wie in der Abbildung 5 deutlich wird, besteht ein signifikanter Anstieg des IL-6 in der NaCl+Shaminfektionsgruppe, verglichen mit der EtOH+Shaminfektionsgruppe. Ebenfalls existiert ein leichter und signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentrationen in

der EtOH+Klebsiellen-Gruppe verglichen mit der EtOH+Shaminfektionsgruppe (vgl. Tabelle 7).

### 3.1.6 IL-6 in der Lunge



**Abbildung 6:**

Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 8:**

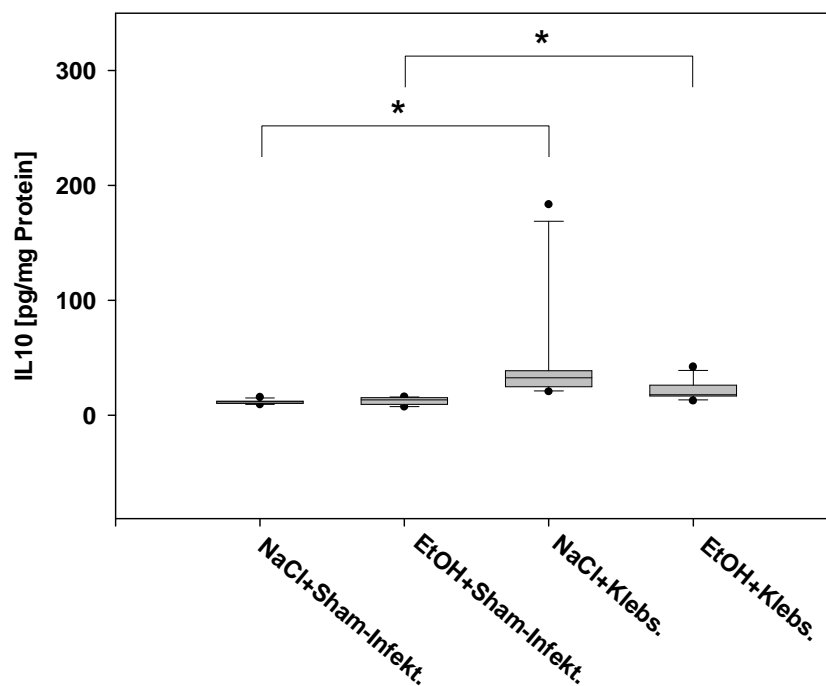
Mediane der IL-6-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	43,60	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,225
EtOH+Sham-Infekt.	32,95	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,010
NaCl+Klebsiellen	72,61	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,063
EtOH+Klebsiellen	197,52	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,002

Die IL-6-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Lungenlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-

Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 6. Wie man anhand der Abbildung 6 und der Tabelle 8 erkennen kann, ist das IL-6-Konzentrationslevel der EtOH+Shaminfektionsgruppe im Vergleich mit der EtOH+Klebsiellen-Gruppe signifikant erniedrigt. Im Vergleich der beiden Klebsiellen-Gruppen ergeben sich massiv erhöhte IL-6-Werte für die mit Alkohol vorbehandelten Tiere. Innerhalb der Shaminfektionsgruppe ließen sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede feststellen.

### 3.1.7 IL-10 in der Milz



**Abbildung 7**

Messung der IL-10-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 9**

Mediane der IL-10-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

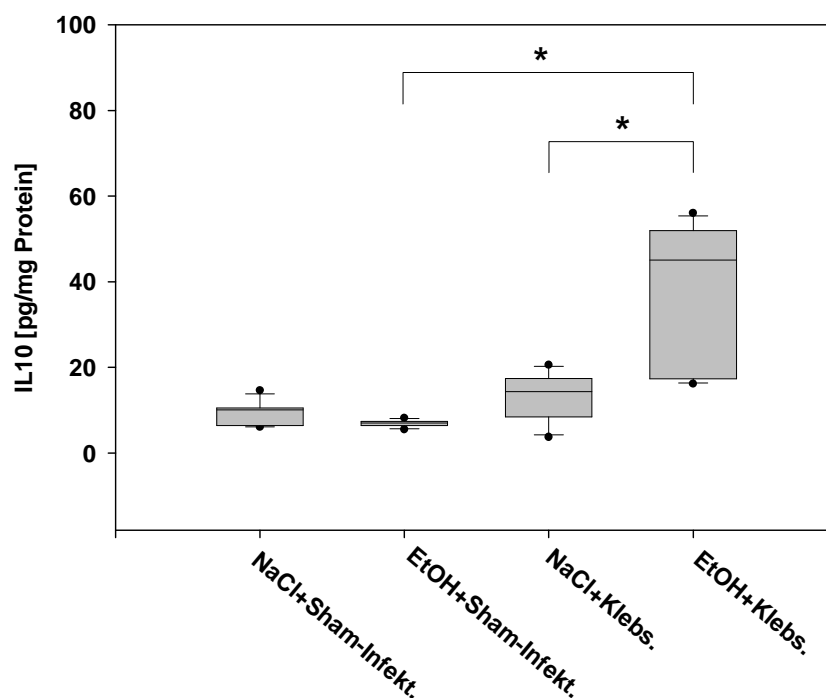
Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere
NaCl+Sham-Infekt.	11,61	7
EtOH+Sham-Infekt.	13,32	7
NaCl+Klebsiellen	32,60	6
EtOH+Klebsiellen	17,78	7

Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,565
NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,086
NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,003
EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,009

Die IL-10-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 7.

Es ergab sich, wie in Abbildung 7 in der Messung des IL-10 in der Milz dargestellt, eine quantitativ zwar nur mäßige, jedoch statistisch signifikante Erhöhung der IL-10-Werte der Klebsiellentiere im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollgruppen (NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen und EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen, siehe auch Tabelle 9).

### 3.1.8 IL-10 in der Lunge



**Abbildung 8**

Messung der IL-10-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 10**

Mediane der IL-10-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	10,05	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,277
EtOH+Sham-Infekt.	6,99	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,022
NaCl+Klebsiellen	14,38	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,199
EtOH+Klebsiellen	45,02	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen	0,002

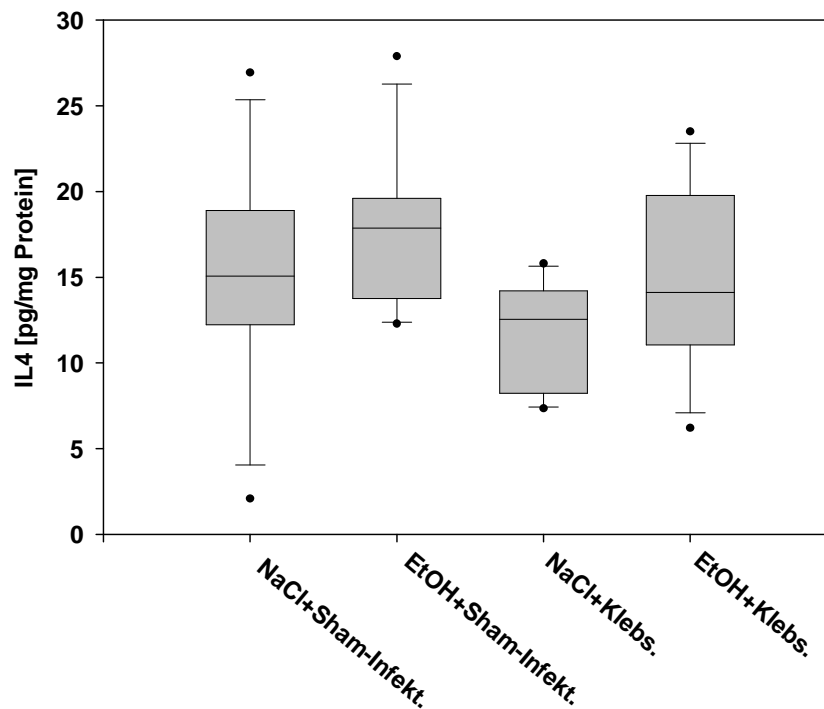
Die IL-10-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 8.

In Abbildung 8 ist deutlich zu erkennen, dass es einen signifikanten Anstieg in der Konzentration des IL-10 der Lungenhomolysate bei den EtOH+Klebsiellen-Tieren gibt; sowohl im Vergleich zu den EtOH+Shaminfektion-Tieren als auch im Vergleich mit den NaCl+Shaminfektion-Tieren.

Die übrigen in Tabelle 10 aufgeführten Vergleiche erbrachten keinerlei signifikante Änderungen der IL-10-Konzentrationen bei den betrachteten Gruppen.



### 3.1.9 IL-4 in der Milz



**Abbildung 9**

Messung der IL-4 Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 11**

Mediane der IL-4-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

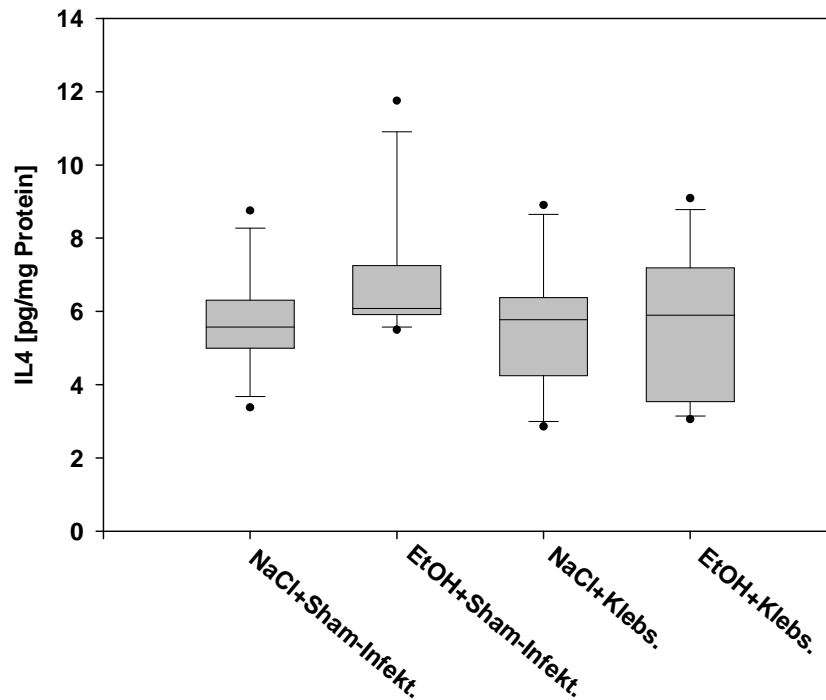
Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	15,07	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,482
EtOH+Sham-Infekt.	17,86	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,391
NaCl+Klebsiellen	12,56	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,253
EtOH+Klebsiellen	14,11	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen.	0,482

Die IL-4-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 9.

Wie man in Abbildung 9 erkennen kann, gestützt durch die in Tabelle 11 zu sehenden p-Werte, lassen sich in den getätigten Vergleichen keine signifikanten

Unterschiede bezüglich der IL-4-Konzentrationen in den Überständen der Milzlysate finden.

### 3.1.10 IL-4 in der Lunge



**Abbildung 10**

Messung der IL-4-Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate, angegeben in pg/mg Protein

**Tabelle 12**

Mediane der IL-4-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

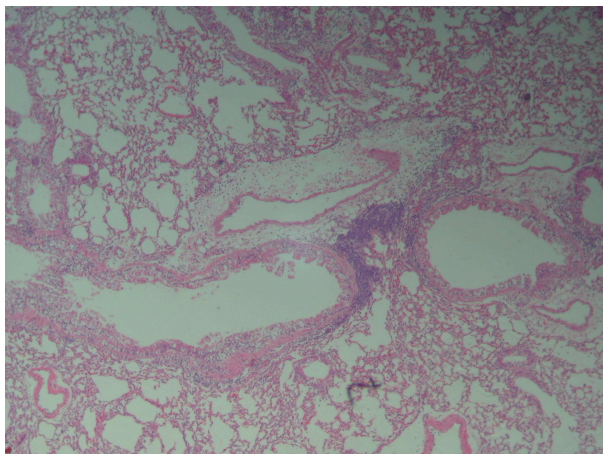
Gruppe	Median [pg/mg]	Anzahl der Tiere	Gruppenvergleich	p-Wert
NaCl+Sham-Infekt.	5,58	7	NaCl+Sham-Infekt. vs. EtOH+Sham-Infekt	0,225
EtOH+Sham-Infekt.	6,08	7	NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen	0,886
NaCl+Klebsiellen	5,78	6	NaCl+Sham-Infekt. vs. NaCl+Klebsiellen	0,886
EtOH+Klebsiellen	5,90	7	EtOH+Sham-Infekt. vs. EtOH+Klebsiellen.	0,371

Die IL-4-Werte wurden mittels ELISA aus den Überständen der Lungenlysate in ihrer Konzentration bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Tiere, die Mediane der einzelnen Gruppen und die errechneten p-Werte in den Gruppenvergleichen sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Die dargestellten p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet, ein p kleiner als 0,05 wurde als signifikant definiert. Dargestellt werden die gemessenen Werte anhand von Boxplots in Abbildung 10.

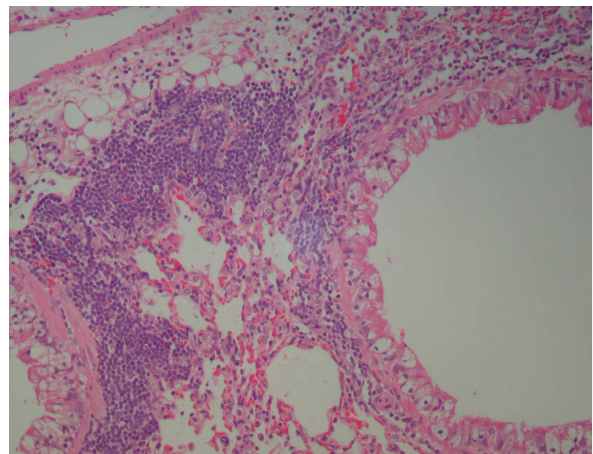
Analog zu den IL-4-Gruppenvergleichen aus der Milz und wie man auch in Abbildung 10 erkennen kann (siehe auch Tabelle 12), lassen sich in den getätigten Vergleichen keine signifikanten Unterschiede der IL-4-Konzentrationen aus den Lungenhomogenaten aufzeigen.

### 3.2 *Histologische Betrachtung*

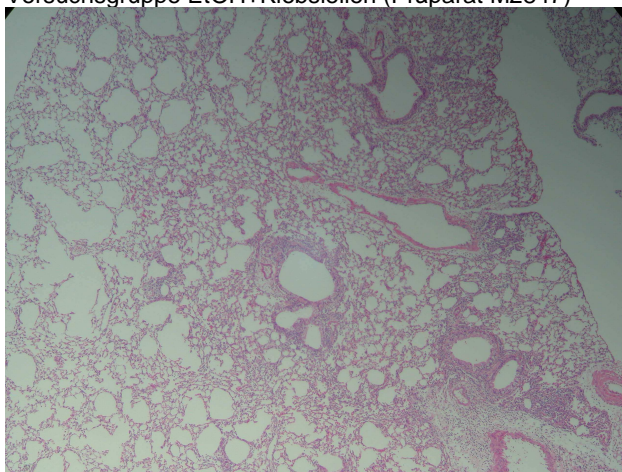
Im Rahmen dieser Studie erfolgte die histologische Aufarbeitung der Milzen, Lungen und Lebern. Um einen zusätzlichen Aspekt zu erhalten, werden in Bild 1 bis 8 exemplarisch einige mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate der Lungen von je 2 Versuchstieren der Gruppen NaCl+Klebsiellen und EtOH+Klebsiellen dargestellt.



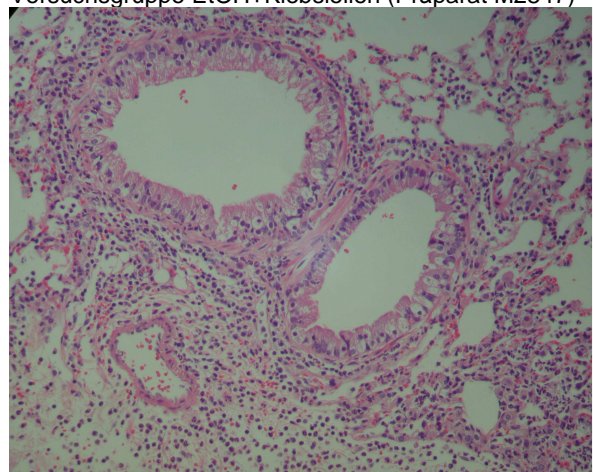
**Bild 1**  
40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2847)



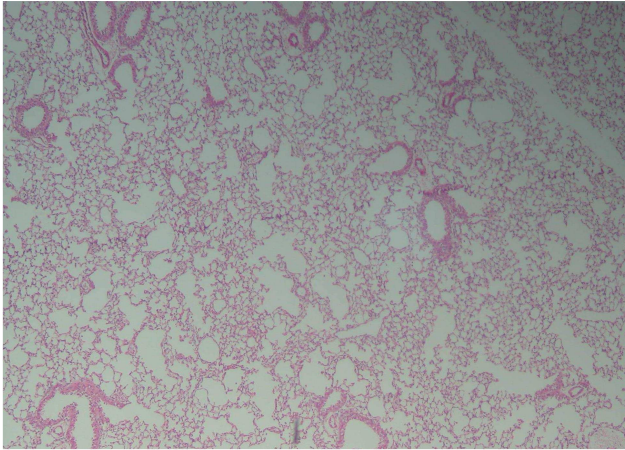
**Bild 2**  
200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2847)



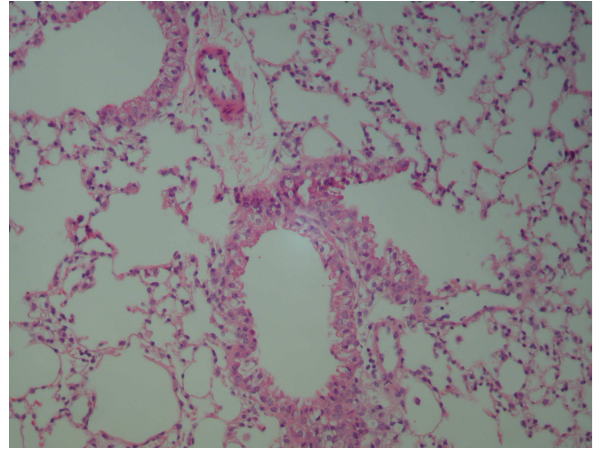
**Bild 3**  
40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2845)



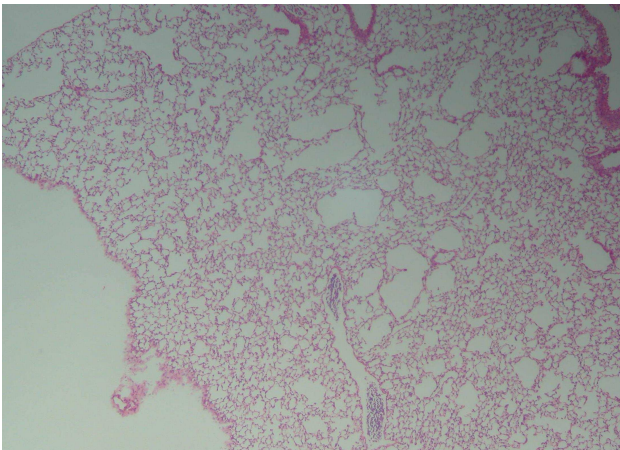
**Bild 4**  
200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2845)



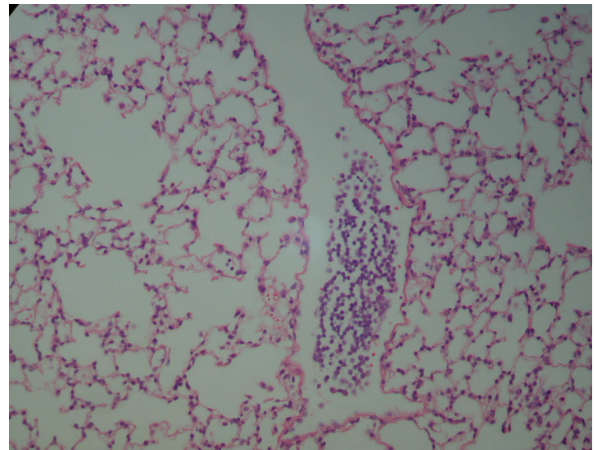
**Bild 5**  
40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2817)



**Bild 6**  
200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2817)



**Bild 7**  
40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2818)

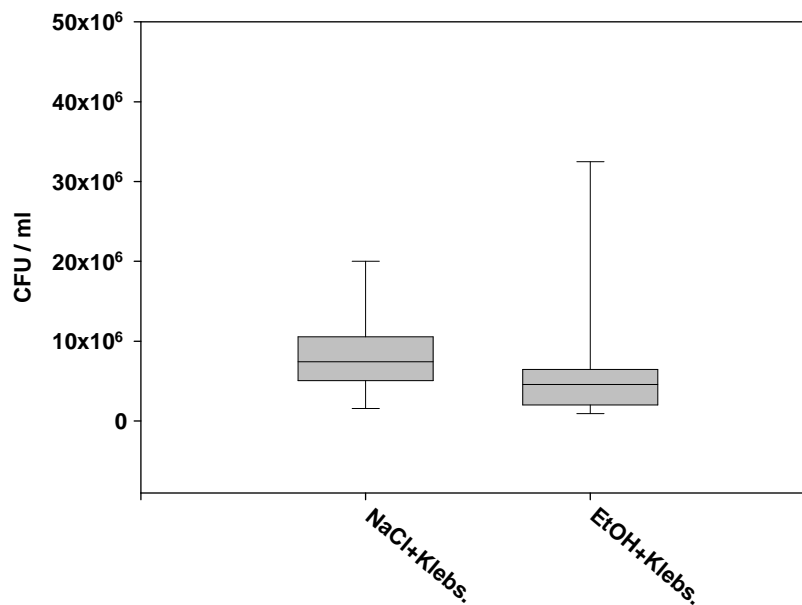


**Bild 8**  
200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der  
Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2818)

Gut zu erkennen ist bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren (Bild 1 bis 4) vor allem eine starke peribronchiale und perivaskuläre Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten. Die normale Parenchymstruktur ist durch Epitheldestruktion, geschädigte Alveolarsepten und der intraalveolären Infiltration von Leukozyten partiell aufgehoben. In der mit NaCl vorbehandelten Gruppe fanden sich einzelne granulozytäre Infiltrate in den Alveolarsepten, peribronchial und perivaskulär, jedoch bildmorphologisch (siehe Bild 5 bis 8) in deutlich verringerter Ausprägung.

### 3.3 **Mikrobiologische und chemisch-analytische Untersuchungsergebnisse von Lungen und Blut**

#### 3.3.1 **Keimzahlen von *Klebsiella pneumoniae* in der Lunge**



**Abbildung 11**

Messung der Keimbelastung der infizierten Lungen 24 Stunden nach Infektion durch Ausstreichen von Verdünnungsreihen homogener Lungen, angegeben in CFU/ml

**Tabelle 13**

Medianwerte der Klebsiellenkonzentrationen in den Lungen der beiden untersuchten Gruppen

Gruppenbezeichnung	Median [CFUx10 <sup>5</sup> /ml]
NaCl+Klebsiellen	74,5
EtOH+Klebsiellen	45,9
p-Wert [NaCl+Klebsiellen vs. EtOH+Klebsiellen] = 0,161	

Die Entnahme und das wenige Zeit später darauf erfolgte Ausplattieren der infizierten und mikrobiologisch aufgearbeiteten Lungen erfolgte 24 Stunden nach der intranasalen Applikation von 10<sup>4</sup> CFU *Klebsiella pneumoniae* pro Tier.

Bei den untersuchten Lungen der Tiere, die der Gruppe NaCl+Klebsiellen angehörten, ergab sich eine Zunahme der Keimlast von ursprünglich applizierten 10<sup>4</sup>

CFU pro Tier auf das 78- bis 2300-fache. Der Median der in den Lungen gemessenen Keimzahlen lag dabei bei einer Konzentration von  $74.5 \text{ CFU} \times 10^5/\text{ml}$ .

Ähnlich stellte sich das bei den Lungen der Tiere dar, welche der Gruppe EtOH+Klebsiellen angehörten. Es kam hier ebenfalls zu einer 64- bis 4360-fachen Steigerung der 24 Stunden zuvor applizierten Keimmenge von  $10^4 \text{ CFU Klebsiella pneumoniae}$  pro Tier.

Die Werte der einzelnen Lungen, die in Tabelle 13 dargestellt werden, sind in Abbildung 11 als Boxplots dargestellt. Wie zu erkennen ist, lagen die Werte der Keimzahlbestimmung beider Gruppen in ähnlichen Regionen, auch die Streuung ist vergleichbar groß.

Die statistische Analyse per Mann-Whitney-U-Test ergab im Vergleich der Gruppen NaCl+Klebsiellen und EtOH+Klebsiellen einen p-Wert von 0,161 (siehe auch Tabelle 13), womit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden betrachteten Gruppen in Bezug auf die Keimbelastung erbracht werden konnte.

Das Ausplattieren der zuvor aufgearbeiteten Lungen von den Tieren der Gruppen NaCl+Sham-Infektion und EtOH+Sham-Infektion ergab nach 24stündiger Bebrütung der Columbia-5%Dextrose-Blutagarplatten und anschließender Auswertung keine Keimbelastung durch *Klebsiella pneumoniae*.

### 3.3.2 Nachweis einer Bakteriämie

In den Ausstrichen von 100  $\mu\text{l}$  und 10  $\mu\text{l}$  nativen Blutes auf Columbiablut-Dextrose(5%)-Platten, zeigten sich nach 24 Stunden Bebrütung bei  $37^\circ\text{C}$  bei 2 von 3 kontrollierten und 24 Stunden vor Aufarbeitung intranasal mit Klebsiellen infizierten Tieren ein Wachstum von ca.  $10^3 \text{ CFU/ml}$  Blut.

### 3.3.3 Blutalkoholbestimmung

**Tabelle 14**

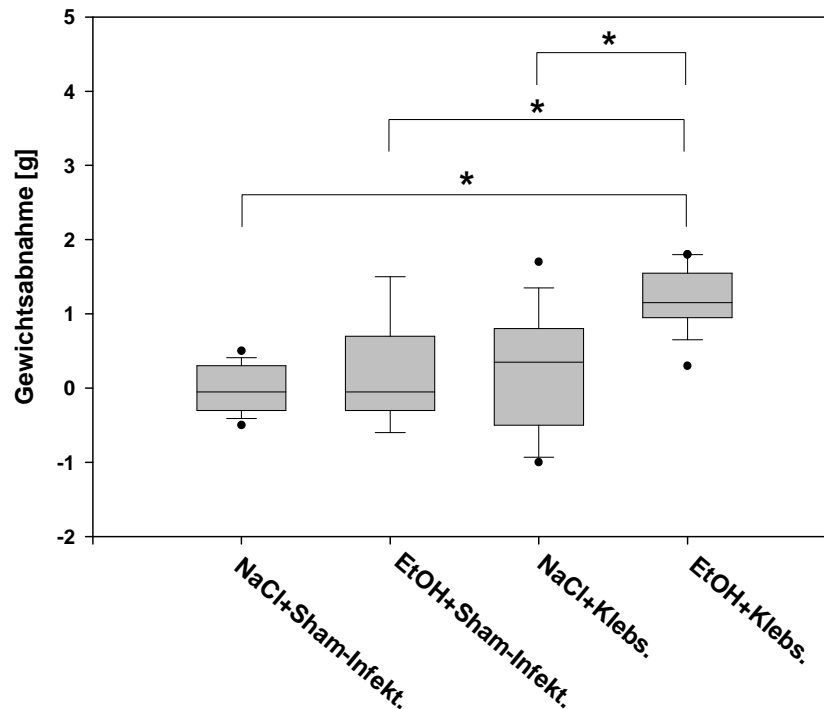
Mediane Ethanolkonzentrationen im Blut der gemessenen Tiere 1 Stunde nach Verabreichung von 3g Ethanol/Kilogramm

Tier	Ethanol [mg/g]	Mittelwert [mg/g]
1	3,36	2,97
2	2,85	
3	3,37	
4	2,03	
Kontrolle	0,00	0

Bei der Blutalkoholbestimmung wurde den Mäusen, denen 60 Minuten zuvor 3 g Ethanol pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal verabreicht wurde, Blut entnommen. Die korrekte Bestimmung erfolgte gaschromatographisch mittels Headspace-Methode. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen. Wie anhand von Tabelle 10 deutlich zu erkennen ist, fand sich ein durchschnittlicher Ethanolspiegel von 2,97 mg/g im Blut der 4 zuvor alkoholisierten Mäuse. Der Blutalkoholspiegel eines nicht alkoholisierten Kontrolltieres betrug 0 mg/g.



### 3.4 Auswertung des Gewichtsverhaltens und der klinischen Scores



**Abbildung 12**  
Gewichtsabnahme zwischen 1. Behandlungstag und 3. postoperativen Tag

**Tabelle 15:**

Mediane der Gewichtsabnahmen der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen

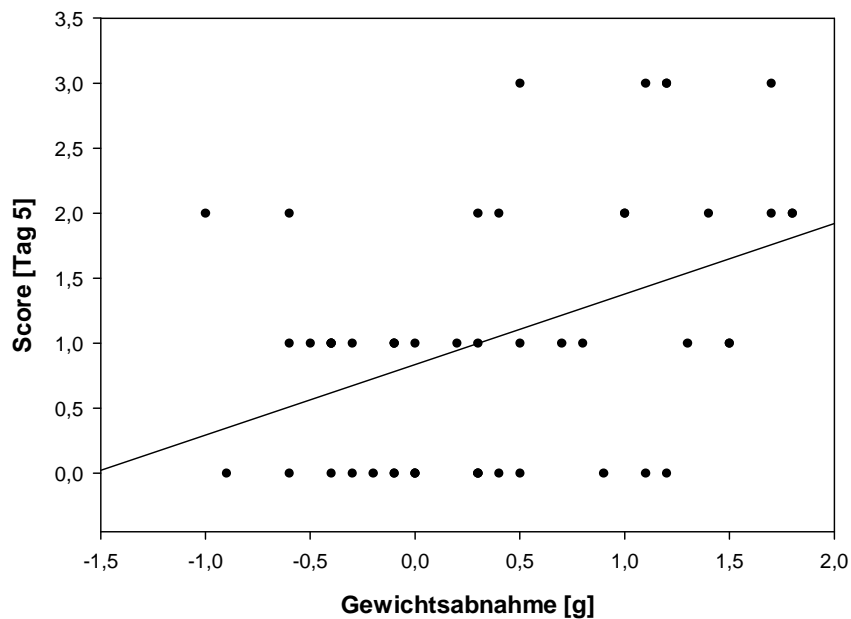
Gruppe	Median [g]	Anzahl der Tiere
NaCl+Sham-Infekt.	0,05	14
EtOH+Sham-Infekt.	0,05	14
NaCl+Klebsiellen	0,35	12
EtOH+Klebsiellen	1,15	12

Gruppenvergleich	p-Wert
EtOH+Klebsiellen vs. NaCl+Klebsiellen	0,007
EtOH+Klebsiellen vs. EtOH+Sham-Infekt.	0,004
EtOH+Klebsiellen vs. NaCl+Sham-Infekt.	0,000

Wie in Abbildung 12 dargestellt, ließ sich in dem Gewichtsverhalten der verschiedenen Gruppen über die gesamte Behandlungsdauer hinweg eine Gewichtsabnahme vor allem der EtOH+Klebsiellen-Tiere beobachten, diese war größer als bei allen anderen Gruppen und auch in den getätigten Vergleichen zu jeder anderen Gruppe signifikant erhöht.

Wie zuvor beschrieben, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experimentes bei jedem Tier klinische Scores erhoben, mit deren Hilfe der Zustand der Tiere beurteilt wurde. Dazu gehören der Zustand des Fells, die motorische Aktivität und

das Aussehen der sichtbaren Schleimhäute inklusive der Bindehäute (siehe Kapitel 2.2.6). Die Einzelkomponenten des Scores ergaben dann in der Summe den Gesamtscore. Im Folgenden habe ich den Gesamtscore des Tages der Tötung (24 Stunden nach Infektion mit Klebsiellen bzw. Shaminfektion) auf Korrelation mit der Gewichtsabnahme vom 1. bis zum letzten Behandlungstag geprüft.



**Abbildung 13**  
Gewichtsabnahme in Korrelation mit dem Score erhoben am Tag der Tötung

Wie man deutlich in der Abbildung 13 erkennen kann, besteht eine positive Korrelation zwischen der Gewichtsabnahme und dem Score des letzten Tages, wodurch ersichtlich ist, dass die Gewichtsabnahme durchaus als Zeichen des verschlechterten Allgemeinzustandes zu sehen ist.

## 4 Diskussion

Ziel der durchgeführten Experimente war es, darzustellen, ob die präoperative 8tägige Alkoholgabe bei Balb/c-Mäusen die Zytokinantwort durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IL-4 im Lungen- und Milzparenchym im Rahmen eines postoperativen pulmonalen Infektes mit *K. pneumoniae* signifikant verändert.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie waren, dass die Ethanol-Vorbehandlung der Versuchstiere im Rahmen der postoperativen Klebsiellenpneumonie zu einer starken Erhöhung der pulmonalen Gewebespiegel von IL-6, IL-10 und tendenziell von IL-1 $\beta$  führte.

Bezug nehmend auf die Fragestellungen zur primären Zielsetzung aus 1.9:

- 1a Die Ethanolvorbehandlung führte nach Induktion einer Pneumonie mit *K. pneumoniae* zu signifikant erhöhten Gewebespiegeln von IL-6 und tendenziell von IL-1 $\beta$  im Lungenparenchym. Im Milzparenchym kam es zu keinen durch die Art der Vorbehandlung bedingten relevanten Unterschieden in den Gewebespiegeln der untersuchten proinflammatorischen Zytokine.
- 1b Die Ethanol-Vorbehandlung führte nach Induktion einer Pneumonie mit *K. pneumoniae* zu einem signifikanten Anstieg des IL-10 im Lungenparenchym. In der Milz kam es hingegen zu keiner durch die Vorbehandlung induzierten Unterschieden der IL-10-Gewebekonzentrationen. Im Rahmen dieser Studie konnten keinerlei Unterschiede der IL-4-Konzentration im Lungen- oder Milzparenchym beobachtet werden. Weder die Vorbehandlung durch Ethanol noch die Klebsielleninfektion führte dort zu signifikanten Änderungen.
- 2 Ohne das Vorliegen einer Pneumonie hatte die Ethanol-Vorbehandlung im Vergleich mit der NaCl-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Konzentrationen der im Lungen- und Milzparenchym bestimmten Zytokine.

Bezug nehmend auf die Fragestellungen zur sekundären Zielsetzung aus 1.9:

- 3 Während post infectionem sowohl IL-6, IL-10 und tendenziell IL-1 $\beta$  durch die Ethanolvorbehandlung starke Anstiege im Lungenparenchym zeigten, konnte im Milzparenchym zwar eine Erhöhung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-10 durch die Infektion mit *K. pneumoniae* gezeigt werden, jedoch war diese von der Art der Vorbehandlung unabhängig. Am primären Ort der Infektion führte die Ethanolvorbehandlung somit zu einer Dysregulation der Zytokinantwort, wohingegen ein Einfluss auf die systemische Zytokinantwort zum Messzeitpunkt nicht erkennbar war.
  
- 4 Die Vorbehandlung mit Ethanol führte im Vergleich mit der Vorbehandlung durch NaCl bei den mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren zu einer histologisch erkennbaren verstärkten Gewebedestruktion und vermehrter Infiltration durch Zellen der Immunabwehr.

#### **4.1 Diskussion der Ergebnisse der bestimmten proinflammatorischen Zytokine**

##### **4.1.1 IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$**

In den Messungen der Zytokine im Milzparenchym ließ sich durch die Infektion mit *K. pneumoniae* ein signifikanter Anstieg des IL-1 $\beta$  und des TNF- $\alpha$  beobachten. Die Vorbehandlung mit Ethanol induzierte dabei keine signifikanten Unterschiede. Im Lungenparenchym zeigten sich nach Klebsielleninfektion ebenfalls deutliche Anstiege des IL-1 $\beta$  mit tendenzieller Erhöhung des IL- $\beta$  bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren. TNF- $\alpha$  zeigte nur bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren nach Infektion mit *K. pneumoniae* einen signifikanten Anstieg im Lungengewebe. Obwohl die mit NaCl vorbehandelten Tiere post infectionem tendenziell ebenfalls einen deutlichen Anstieg im Vergleich mit den Shaminfektionstieren boten, zeigte sich aufgrund der hohen Streuung in der Gruppe der mit Klebsiellen infizierten Tiere kein signifikanter Unterschied.

In der frühen Phase einer Klebsiellenpneumonie kommt vor allem der nicht spezifischen Abwehr eine bedeutende Aufgabe zu. Es erfolgt eine starke Aktivierung der zur Phagozytose befähigten Zellen wie Makrophagen und Neutrophilen. In diesem Zusammenhang sind es vor allem IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , welche diese Aufgabe übernehmen. Sie sind wichtige Aktivatoren dieser Zellen und werden selbst vor allem von Makrophagen gebildet, stimuliert durch Bakterien und bakterielle Produkte <sup>(12)</sup>.

Bei den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen zeigten sich bereits in den Milzen nach Klebsielleninfektion deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , wobei jedoch die Vorbehandlung mit Ethanol zu keinem signifikanten Unterschied führte.

Nachdem für die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  im Lungenparenchym ein Anstieg um ein Vielfaches durch die Infektion mit Klebsiellen präsentiert werden konnte, zeigte sich im Falle des TNF- $\alpha$  unter der Infektion mit Klebsiellen eine viel geringere Erhöhung und diese auch nur nach Ethanolvorbehandlung. Die Kinetik von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  betreffend gibt es unterschiedliche Beobachtungen. So zeigten verschiedene Studien, dass TNF- $\alpha$  seine maximalen Gewebekonzentrationen in der Lunge 6 bis 12 Stunden nach Inokulation von Pneumokokken oder Klebsiellen erreicht und nach 24 Stunden schon wieder stark abgefallen ist <sup>(4,70)</sup>. So könnte der in dieser Studie gewählte Messzeitpunkt zu spät gewählt sein, um deutlichere Veränderungen der gruppenspezifischen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen darzustellen. Dem entgegen gibt es auch Studien, die nach intratrachealer Applikation von Klebsiellen bis 48 Stunden nach Infektion einen kontinuierlichen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Gewebespiegel in Lungenhomogenaten zeigen <sup>(21)</sup>.

Auffällig ist, dass TNF- $\alpha$  im Milzparenchym durch die Infektion mit Klebsiellen deutlicher und homogener anstieg als im Lungenparenchym. Geht man davon aus, dass eine Bakteriämie zeitversetzt zur pulmonalen Infektion auftrat, so wäre auch der Zeitpunkt der maximalen TNF- $\alpha$ -Sekretion im Milzparenchym deutlich später als in der Lunge. Die Diskrepanz zwischen den pulmonalen und den splenischen Gewebekonzentrationen wäre dadurch zu erklären. IL-1 $\beta$  erreicht zwar auch 12 Stunden post infectionem maximale Konzentrationen im Lungengewebe, hält diese aber deutlich länger aufrecht als TNF- $\alpha$  <sup>(4)</sup>, was den Unterschied in den Gewebespiegeln dieser beiden synergistisch wirkenden Zytokine erklärt.

Es war Ziel dieser Arbeit, die Faktoren chronischer Ethanolkonsum und postoperative Pneumonie gemeinsam zu untersuchen. Ginge man davon aus, dass die Kinetik von TNF- $\alpha$  nicht allein für die nur geringen Konzentrationsänderungen in den Gruppenvergleichen verantwortlich ist, so gäbe es eine weitere Erklärungsmöglichkeit. In anderen sich auf die postoperative Ausschüttung von Interleukinen aus Monozyten beziehende Studien wurde oftmals eine postoperativ verminderte TNF- $\alpha$ - Antwort auf LPS- bzw. bakterielle Stimulation hin beschrieben<sup>(5,54)</sup>. So ist möglicherweise alternativ für den nur geringen Anstieg der Lungen-TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in beiden Klebsiellengruppen ein zu hoher Stimulus durch die vorangegangene Operation der Mäuse ursächlich. Mutmaßlich war dieser so hoch, dass ein potentieller Alkoholeffekt auf die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung dadurch maskiert bzw. unterdrückt wurde. Ein Erklärungsansatz wäre also, dass die operative Vorbehandlung eine Insuffizienz in der TNF- $\alpha$ -Produktion der Phagozyten bedingt hat und somit die operative Vorbehandlung einen suffizienten Anstieg des TNF- $\alpha$  im Lungenparenchym post infectionem nicht ermöglichte.

Unter der Infektion mit Klebsiellen ließen sich im Lungengewebe weder bei IL-1 $\beta$ , noch bei TNF- $\alpha$  signifikante Unterschiede nachweisen, die durch die Vorbehandlung bedingt gewesen wären. Festzustellen ist jedoch, dass der Median der IL-1 $\beta$ -Werte in der Alkohol+Klebsiellen-Gruppe das 3fache dessen der NaCl+Klebsiellen-Gruppe beträgt. Ein tendenzieller Unterschied nach Ethanol-Vorbehandlung kann hier also zumindest für IL-1 $\beta$  festgestellt werden. Dies ist als prädiktiv ungünstig zu werten, da hohe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen als mitverursachend für die Entwicklung eines septischen Schockes gesehen wurde<sup>(59)</sup>.

Bergeron et al beobachteten bei CD1-Mäusen nach intratrachealer Verabreichung von  $10^7$  CFU *S. pneumoniae* bereits innerhalb von 12 Stunden maximale Werte für TNF- $\alpha$  und IL-1 im Lungenparenchym und in der bronchoalveolären Lavage. Bereits 24 Stunden nach Infektion waren diese bereits stark rückläufig. Greenberger et al hingegen beschrieben einen deutlichen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Spiegel bei Balb/c-Mäusen nach intratrachealer Verabreichung von  $10^3$  CFU Klebsiellen nach 24 Stunden, maximale Spiegel jedoch erst 48 Stunden post infectionem. Um letztlich zu klären, ob die hier nur gering gesteigerten TNF- $\alpha$ -Werte hauptsächlich der postoperativen Insuffizienz der TNF-produzierenden Zellen geschuldet sind, wären

Messungen in engmaschigeren Abständen und zu früheren Zeitpunkten nach der Infektion mit Klebsiellen nötig gewesen.

IL-10 als potentes antiinflammatorisches Zytokin kann, vor allem bei vermehrter Ausschüttung, die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  im Gewebe erniedrigen. In den Lungen wurden bei den mit Ethanol vorbehandelten und mit Klebsiellen infizierten Tieren hohe Konzentrationen von IL-10 gemessen. Es konnte in klinischen Studien bereits gezeigt werden, dass Patienten mit Alkoholabusus in der Anamnese postoperativ zu einer erhöhten Suszeptibilität in Bezug auf Pneumonien neigen. Dies wird einer durch erhöhte IL-10-Spiegel verursachten Immunsuppression mit erniedrigten Konzentrationen von unter anderem TNF- $\alpha$  zugeschrieben. Trotz des Vorliegens von immens hohen IL-10-Spiegeln im Lungenparenchym der infizierten und mit Ethanol vorbehandelten Tiere ist jedoch ein direkter Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Konzentration in dieser Gruppe nicht zu zeigen.

#### 4.1.2 IL-6

Neben der signifikant verminderten IL-6-Konzentration nach Ethanolvorbehandlung in der Gruppe der Shaminfektionstiere zeigte sich in den Milzen nach Klebsielleninfektion eine signifikante Zunahme des IL-6. Verglichen mit der mit NaCl vorbehandelten Gruppe lässt sich jedoch kein ethanolbedingter Unterschied erkennen. Betrachtet man die Abbildung 5 und die Tabelle 7, stellt man fest, dass die Mediane in allen betrachteten Gruppen sehr nahe beieinander liegen. So kann meines Erachtens trotz vorliegender und beschriebener Signifikanzen dort nicht von klinisch relevanten Unterschieden ausgegangen werden.

Im Lungenparenchym, wo die Ethanolvorbehandlung nach der Shaminfektion nicht zu signifikanten Veränderungen der IL-6-Spiegel führte, war eine deutliche Zunahme des IL-6 bei den mit Ethanol vorbehandelten und postoperativ mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren zu erkennen. Die mit NaCl vorbehandelten und postoperativ mit Klebsiellen infizierten Tiere boten tendenziell einen Anstieg des IL-6 im Lungenparenchym - verglichen mit der Shaminfektionsgruppe jedoch ohne statistische Signifikanz und deutlich geringer als nach Vorbehandlung mit Ethanol.

Obwohl durch chronische Ethanol-Exposition im Mausmodell als auch bei humanen Blutmonozyten eine Verringerung der IL-6-Produktion auftrat <sup>(83,105)</sup>, wurde beschrieben, dass es bei chronisch alkoholkranken Patienten posttraumatisch zu

deutlich erhöhten IL-6-Spiegeln kam und mit schweren Komplikationen assoziiert war<sup>(102)</sup>.

So führte auch in dieser Studie die Ethanolvorbehandlung zu einer Erhöhung der IL-6-Spiegel, in besonderem Maße im Lungenparenchym bei Vorliegen einer Klebsielleninfektion. Da IL-6 ein Zytokin ist, das Gewebeschädigung anzeigt<sup>(5,18)</sup>, liegt anhand der hier deutlich erhöhten IL-6-Konzentrationen bei den präoperativ mit Ethanol vorbehandelten und postoperativ mit Klebsiellen infizierten Tieren pulmonal eine vermehrte Gewebedestruktion vor. Dies korreliert mit dem schlechteren Allgemeinzustand der Tiere und kann auch anhand der histologischen Bilder, der Gewichtsabnahme und der Scorereduktion nachvollzogen werden.

Gleichwohl gehen diese Beobachtungen mit denen von Martins et al. einher, die feststellten, dass die Höhe der Plasma-Level von IL-6 mit der Schwere einer Sepsis korreliert und hohe IL-6-Spiegel dabei als für das Outcome der Patienten prognostisch ungünstig zu werten waren<sup>(40)</sup>. Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass die Ethanolvorbehandlung der Tiere im Falle einer Klebsiellenpneumonie eine starke Erhöhung des IL-6 im Lungenparenchym zur Folge hatte. Die dadurch angezeigte verstärkte Gewebedestruktion lässt sich anhand der abgebildeten Histologien nachvollziehen. Die pulmonal erhöhten IL-6-Konzentrationen sind ein Hinweis auf eine gestörte Immunantwort mit deutlich geringeren Chancen, die Pneumonie zu überwinden.

## **4.2            *Diskussion der Ergebnisse der bestimmten antiinflammatorischen Zytokine***

### **4.2.1        IL-10**

Im Milzparenchym fand nach Infektion mit *K. pneumoniae* ein von der Art der Vorbehandlung unabhängiger, signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentrationen statt. Im Lungenparenchym kam es nach Vorbehandlung mit NaCl post infectionem zu keinen signifikanten Konzentrationserhöhungen. In den Lungen der mit Ethanol vorbehandelten Mäuse zeigte sich jedoch nach Infektion mit *K. pneumoniae* ein deutlicher und signifikanter Anstieg des IL-10.

Nach der proinflammatorischen Phase im Rahmen einer akuten mikrobiellen Infektion, an dessen Einleitung IL-6 maßgeblich beteiligt ist, ist es IL-6 möglich, eine



zweite, antiinflammatorische Phase über eine Stimulation von IL-10 einzuleiten. IL-10 wird jedoch nicht nur durch IL-6 in der Produktion angeregt, vor allem auch gram-negative Bakterien, wie unter anderem Klebsiellen, sind in der Lage, Monozyten direkt zur verstärkten IL-10-Produktion zu stimulieren <sup>(23)</sup>. IL-10 ist ein hochpotent antiinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches unter anderem die TNF- $\alpha$ - und IL-1-Ausschüttung vermindert. Hohe Konzentrationen von IL-10 und eine erhöhte IL-10/TNF- $\alpha$ -Ratio waren bei septischen Patienten mit einer erhöhten Mortalität verbunden <sup>(99)</sup>. Durch hohe Spiegel von IL-10 ist die Inzidenz von Infektionen am 3. postoperativen Tag besonders hoch <sup>(74,101)</sup>. In den von mir dargelegten Daten kommt es unter dem Einfluss von präoperativer Alkoholgabe im Vergleich zu der mit Kochsalz vorbehandelten Gruppe zu einer verstärkten Hochregulation von IL-10 nach der Infektion mit *Klebsiella pneumoniae*. In klinischen Studien hat sich neben einer höheren Inzidenz von nosokomialen Pneumonien bei Patienten mit Alkoholabusus in der Vorgeschichte auch ein prolongierter sowie schwerer Krankheitsverlauf und eine höhere Letalität nachweisen lassen <sup>(22)</sup>. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei Alkoholabusus ein schlechteres Outcome und eine erhöhte Empfänglichkeit für *K. pneumoniae* mit erhöhten IL-10-Leveln und einer daraus resultierenden Immunsuppression verbunden sind <sup>(37,63)</sup>. In einem murinen Modell konnte nach Applikation von IL-10 eine deutlich eingeschränkte bakterielle Clearance mit verringerten Überlebensraten der Tiere im Rahmen eines pulmonalen Infektes mit Pneumokokken nachgewiesen werden <sup>(98)</sup>. Wurden hohe IL-10-Spiegel artifiziell neutralisiert, konnte im Rahmen von Pneumonien, welche durch Klebsiellen verursacht wurden, eine verminderte Letalität mit deutlich erhöhter bakterieller Clearance und verminderter Schwere der Entzündung erzielt werden <sup>(21)</sup>.

Die vermehrte Aktivität von IL-10 im Lungenparenchym der mit Ethanol vorbehandelten und mit Klebsiellen infizierten Tiere ist aufgrund der dadurch resultierenden Immunsuppression als für das Outcome prognostisch schlecht einzustufendes Zeichen zu werten. Dies wird durch den erhöhten Gewichtsverlust, den verminderten Allgemeinzustand und der histologisch aggravierten Gewebedestruktion bei diesen Tieren unterstrichen.

Dem entgegen führten eine Infektion der mit Kochsalzlösung vorbehandelten Tiere als auch eine Ethanol-Vorbehandlung und postoperative Shaminfektion nicht zu einem signifikanten Anstieg des IL-10 im Lungenparenchym. Die postoperative Klebsielleninfektion nach Ethanol-Vorbehandlung führt pulmonal zu stark erhöhten

IL-10-Konzentrationen und weist somit auf eine durch die Alkoholgabe prädisponierte und durch die Klebsielleninfektion manifest gewordene immunologische Dysregulation hin.

Trotz nachgewiesener Bakteriämie bot sich im Milzparenchym ein ganz anderes Bild. Die Vorbehandlung der Tiere mit Ethanol für sich genommen bedingte 24 Stunden nach der Infektion mit Klebsiellen im Gegensatz zur Produktion in der Lunge keine signifikant höheren Konzentrationen von IL-10.

Es ist anzunehmen, dass die Bakteriämie zeitlich versetzt zur pulmonalen Infektion auftritt. Da die intraperitoneale Ethanolapplikation eine Beeinflussung des gesamten Immunsystems bedingt, hätten spätere Messungen möglicherweise auch hier einen stärkeren Anstieg im Milzparenchym aufgezeigt.

#### 4.2.2 IL-4

In Studien, die sich mit dem Verhalten und Auswirkungen von IL-4 beschäftigten, konnte nachgewiesen werden, dass dieses Zytokin durch chronische Alkoholapplikation verringert war. Da IL-4 die Produktion von  $T_{H1}$ -Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 verringert, ist bei Erniedrigung der IL-4-Konzentrationen aufgrund der daraus resultierenden dysregulierten proinflammatorischen Zytokinantwort mit einem schlechteren Outcome bei pulmonalen Infektionen zu rechnen. Es konnten in den durchgeführten Experimenten keine Veränderungen der IL-4-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung oder der Infektion bzw. Shaminfektion gesehen werden. So zeigten sich weder im Lungenparenchym noch im Milzparenchym signifikante Unterschiede in der IL-4-Produktion, welche durch die Ethanolapplikation oder die Infektion mit *K. pneumoniae* begründet wären. Es wurde sowohl für operativen Stress als auch für chronischen Alkoholkonsum nachgewiesen, dass diese beiden Faktoren zu einem Shift zugunsten der  $T_{H2}$ -Antwort mit konsekutiver Erhöhung der IL-4-Konzentrationen führt. Die 8tägige Alkoholapplikation hat in diesem Modell keine direkte Auswirkung auf die Konzentrationen von IL-4 in Milz und Lunge, wenn man die unterschiedlichen Gruppen dahingehend vergleicht. Nach operativem Stress, dem alle Tiere der betrachteten Gruppen ausgesetzt waren, kann man also in diesem Modell keine durch die 8tägige Ethanolapplikation oder die 24 Stunden zurückliegende Klebsielleninfektion hervorgerufene IL-4-Veränderung nachweisen.

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 wurden in vielen Untersuchungen, die die Auswirkungen von Ethanol und operativem Stress thematisierten, untersucht. Dabei konnten für jeden dieser beiden Faktoren Mechanismen zugrunde gelegt werden, die zur Elevation von IL-4 und IL-10 führten. Akute Ethanolapplikation bedingte elevierte Level von IL-10<sup>(39,85,84)</sup>. Ebenso konnte ein Shift in Richtung des T<sub>h2</sub>-Subsets nach akuter Ethanolapplikation und durch operativen Stress nachgewiesen werden<sup>(33,43,103)</sup>. Bei Untersuchungen an Mäusen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es zu einer Verringerung der IL-4-Spiegel sowohl durch akuten als auch durch chronischen Alkoholkonsum kam<sup>(45,105)</sup>. Sowohl in den Milzen als auch in den Lungen kam es durch die Ethanolvorbehandlung ohne postoperative Pneumonie nicht zu einer Veränderung der Zytokinlevel von IL-10 und IL-4. Da operativer Stress an sich zu einem T<sub>h2</sub>-Shift führt, wäre denkbar, dass durch den hohen OP-Stress der Versuchstiere der erwartete Anstieg des IL-4 nicht sichtbar wurde.

### **4.3            *Klinische, mikrobiologische und histologische Betrachtung***

Wie gezeigt werden konnte, korrelierte ein vermehrter Gewichtsverlust im Verlaufe der Behandlung positiv mit einem schlechteren klinischen Gesamtscore. Des Weiteren konnte deutlich gemacht werden, dass die mit Ethanol vorbehandelten und postoperativ infizierten Tiere im Vergleich mit den anderen 3 betrachteten Gruppen einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust aufwiesen. Dieser hohe Gewichtsverlust impliziert, dass für die mit Ethanol vorbehandelten Tiere die Klebsielleninfektion im Vergleich zu den mit NaCl vorbehandelten Tieren ein viel höherer Stressfaktor darstellte. Aus klinischen Gesichtspunkten heraus konnte somit festgestellt werden, dass die Vorbehandlung mit Ethanol ein scheinbar schlechteres Outcome dieser Tiere induzierte.

Eine Vermutung war, dass die Vorbehandlung mit Ethanol eine verschlechterte bakterielle Clearance verursachte. Die daraufhin durchgeführten quantitativen Bestimmungen der koloniebildenden Einheiten in den Lungen 24 Stunden post infectionem zeigten allerdings kein signifikant abweichendes Keimwachstum bei den

mit Ethanol vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den mit NaCl behandelten. Eine erhöhte Keimbelastung konnte also als Grund für den schlechteren Allgemeinzustand der mit Ethanol vorbehandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt nicht belegt werden.

Da im Rahmen des Projektes histologische Präparate der entnommenen Organe angefertigt wurden, wurden diese im Hinblick auf morphologische Unterschiede der einzelnen Gruppen untersucht. Es konnte in den hier dargestellten histologischen Bildern gezeigt werden, dass sich im Vergleich der beiden mit Klebsiellen infizierten Gruppen deutliche histologische Unterschiede ergaben. So stellte sich bei den mit Ethanol vorbehandelten Tieren vor allem eine starke peribronchiale und perivaskuläre Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten mit partiellem Verlust der normalen Parenchymstruktur dar. Des Weiteren zeigten sich ebenfalls Epitheldestruktionen, Schädigungen der Alveolarsepten und intraalveoläre Aggregation von Entzündungszellen. Auch in der mit NaCl vorbehandelten Gruppe fanden sich einzelne granulozytäre Infiltrate in den Alveolarsepten, peribronchial und perivaskulär, jedoch bildmorphologisch in deutlich verringerter Ausprägung. Der mit Ethanol vorbehandelten und mit Klebsiellen infizierten Gruppe kann neben den Entgleisungen vor allem der IL-6 und IL-10-Spiegel im Lungenparenchym und dem bereits auffällig erhöhten Gewichtsverlust also auch histologisch eine vermehrte Entzündungsreaktion zugeordnet werden.

#### **4.4 Methodenkritik**

In dieser Arbeit soll dargestellt werden, inwiefern die chronische Alkoholgabe die Zytokinantwort im Setting einer postoperativen Pneumonie verändert. Bezogen auf tierexperimentelle Modelle wurden Alkoholgaben zwischen 5 Tagen und 13 Wochen beschrieben <sup>(44,71)</sup>. Zeitspannen darunter bzw. einmalige Ethanolgaben werden als akut bezeichnet <sup>(39,85,82,84)</sup>. Um alkoholtoxische Organschäden oder eine psychiatrische Abhängigkeit mit Ethanol-Modellen zu erzeugen, ist meist eine mehrwöchige Applikation vonnöten. Um jedoch immunologische Auswirkungen sichtbar zu machen, genügen viel kürzere Zeitspannen <sup>(30,35)</sup>. Die 8tägige Alkoholapplikation ist in diesem Modell als chronisch anzusehen und diente dem Ziel,

immunologisch signifikante Veränderungen herbeizuführen ohne alkoholbedingte Organschäden wie zum Beispiel strukturelle Lebererkrankungen zu induzieren.

Die intraperitoneale Gabe von Ethanol zeichnete sich durch eine sehr gute Handhabung aus und konnte die exakte Dosierung bezogen auf das Körpergewicht ermöglichen. Hinsichtlich der statistischen Vergleichbarkeit erschien die intraperitoneale Injektion als sinnvollste Applikationsart für die zu untersuchende Hypothese. Es konnten bei den Versuchsgruppen ohne Infektion mit Klebsiellen keine durch Ethanol bedingten Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen im Lungen- und Milzgewebe gezeigt werden. Eine genauere Betrachtung diesbezüglich wäre einerseits durch eine deutlich längere Ethanolexposition, jedoch ohne Organschäden zu induzieren, und andererseits durch eine höhere Dichte an Messzeitpunkten möglich und zu diskutieren.

Die Durchführung einer Medianlaparotomie unter Isoflurannarkose mit anschließender Mobilisation des linken Leberlappens entsprach einem operativen Eingriff, der bei den Versuchstieren erheblichen körperlichen Stress induzierte. Dieses Modell wurde aufgrund dieser Eigenschaften primär ausgewählt, um die postoperative Immunlage alkoholkranker Patienten so nah wie möglich in ein murines Modell zu portieren.

Um den Allgemeinzustand der behandelten Tiere beurteilen zu können, wurde ein klinischer Gesamtscore mithilfe von 3 verschiedenen Kriterien erhoben. Diese 3 Kriterien waren der Grad der Piloerektion, das Ausmaß an Sekretion aus den Körperöffnungen und die motorische Aktivität. Separat davon wurden die Tiere regelmäßig gewogen. So ergab sich pro Tier zu jedem Untersuchungszeitpunkt ein Gesamtscore aus den 3 genannten Unterkategorien und das momentane Gewicht. Der Gesamtscore setzt sich dabei nur aus der Summe der vergebenen Punkte zusammen und berücksichtigt hinsichtlich der Unterkategorien keine Gewichtung der einzelnen Komponenten. So ist die Sekretion ein weitaus besser objektivierbares Kriterium als die Piloerektion und die motorische Aktivität. Die motorische Aktivität und - wenn auch in verringertem Maße - ebenso die Piloerektion des Tieres unterliegen verstärkt der Beeinflussung durch den Untersucher als die Sekretion der Schleimhäute. Daraus resultierte, dass einem Tier mit mäßigem Ausfluss und struppigem Fell aber mit normaler Bewegung und einem Tier mit leicht ungepflegtem

Fell und relativ apathischem Verhalten, der gleiche klinische Score zukam, wobei das Tier mit der Sekretion aus Augen und After mutmaßlich in schlechterem Allgemeinzustand war, als das Zweitgenannte. Dessen ungeachtet, erfolgte auch aufgrund fehlender Erfahrungswerte in der Fachliteratur in dieser Untersuchung keine Wichtung der einzelnen Parameter.

In den mikrobiologischen Untersuchungen des Blutes zeigte sich 24 Stunden post infectionem bei 2 von 3 untersuchten Tieren eine Bakteriämie. Somit war nicht nur die Entnahme und vielfältige Untersuchung der Lungen indiziert, sondern als an der systemischen Abwehr maßgeblich mitbeteiligtes, lymphatisches Organ waren ebenfalls die entsprechenden Aufarbeitungen der Milzen angezeigt.

Die histologische Untersuchung erfolgte hier nur von je 2 Tieren der Ethanol+Klebsiellen-Gruppe und der NaCl+Klebsiellen-Gruppe. Die Aussagekraft der dargestellten Histologien ist daher aufgrund der geringen Zahl und wegen des Fehlens von standardisierten Auswertungsverfahren recht eingeschränkt. Die genauen Ergebnisse werden allerdings in einer gesonderten Dissertation behandelt und sollen hier nur zur Aussagenunterstützung dienen.

#### **4.5 Zusammenfassung**

Zielstellung war es, Veränderungen des Immunsystems während einer postoperativen Pneumonie durch eine 8tägige Alkoholvorbehandlung anhand ausgewählter Zytokine zu überprüfen und das verwendete murine Modell auf seine Aussagekraft bezüglich immunologischer Konsequenzen von kurzem, jedoch exzessivem und als chronisch zu bezeichnenden präoperativen Alkoholkonsum zu prüfen und weiter zu etablieren.

Es zeigte sich bei den präoperativ mit Ethanol behandelten und postoperativ mit Klebsiellen infizierten Tieren in den Proteinisolationen aus dem Lungengewebe ein starker Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des antiinflammatorischen IL-10.

Signifikant erhöhte Zytokinspiegel im Vergleich zu den mit NaCl vorbehandelten und postoperativ mit Klebsiellen infizierten Tieren und zur mit Ethanol vorbehandelten und postoperativ shaminfizierten Gruppe zeigten sich beim IL-6 und IL-10 im

Lungengewebe. Obwohl in der Literatur für chronischen Alkoholkonsum und für operativen Stress ein Shift zugunsten der  $T_{H2}$ -Antwort mit IL-4 als seinem Leit-Zytokin beschrieben ist, kam es in dieser Studie weder im Milz- noch im Lungenparenchym zu einer signifikanten Veränderung des IL-4.

Die postinfektiöse Bakteriämie induzierte Veränderungen in den Zytokinmustern in den untersuchten Milzen. Die Infektion führte dabei zu Elevationen der IL-1 $\beta$ -, TNF- $\alpha$ - und IL-10-Spiegel. Ein durch die Vorbehandlung der Tiere induzierter Unterschied konnte nicht gezeigt werden.

Hinsichtlich der untersuchten klinischen Kriterien wurde ersichtlich, dass die Ethanolapplikation eine signifikante Veränderung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere bei postoperativer Pneumonie bewirkte. So waren die Piloerektion, die Sekretion über die Schleimhäute und die motorische Passivität als auch der Gewichtsverlust bei diesen Tieren verstärkt. Anhand der hier gezeigten histologischen Präparate der Lungen zeigte sich bei den angesprochenen Tieren eine vermehrte Entzündungsaktivität und Gewebedestruktion.

So konnte in diesem Modell ein klarer Zusammenhang zwischen präoperativem Alkoholkonsum und postoperativer Pneumonie, einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes, einer erhöhten histomorphologischen Gewebedestruktion und einer dysregulierten Zytokinantwort im Lungengewebe, vor allem anhand der gemessenen IL-6- und IL-10-Spiegel hergestellt werden. Die im Vergleich zu IL-6 und IL-1 $\beta$  nur geringgradigen Veränderungen des TNF- $\alpha$  stützen die Theorie, dass TNF- $\alpha$  stärker der postoperativen Toleranzentwicklung unterliegt und dass durch den bereits erwähnten Synergismus von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , eine kompensatorische Erhöhung von IL-1 $\beta$  resultiert.

Um genauer zu klären, inwiefern die hier dokumentierte Paralyse des IL-4 durch eine postoperative Toleranzentwicklung erklärbar ist, wären vergleichende Untersuchungen zu einem nicht-operativen, jedoch sonst ähnlichen murinen Modell indiziert.

Das benutzte murine Ethanol/OP/Infektions-Modell gibt anhand der dargestellten Veränderungen bereits gute Aufschlüsse bezüglich der immunologischen Veränderungen auf der Zytokinebene im Lungen- und Milzparenchym nach chronischer, systemischer Ethanolexposition. Um allerdings ein besseres Verständnis der immunologischen Veränderungen durch die präoperative Ethanolexposition und operativen Stress zu erhalten und um dieses Modell langfristig

als Testebene für immunologische Therapieansätze zu benutzen, wären jedoch weitere Modifikationen nötig. Um die immunologischen Auswirkungen von präoperativer Ethanolapplikation möglicherweise besser nachzuvollziehen, wären eine Verlängerung der Ethanolexposition zum einen und das Einfügen von mehreren Messzeitpunkten zum anderen sinnvoll. Somit könnten früh auftretende Veränderungen in den Spiegeln von z. B. TNF- $\alpha$  besser erfasst werden. Das Setzen von mehreren Messzeitpunkten gäbe einen Ausblick auf die Kinetik der verschiedenen Zytokine. Dieses wiederum könnte dann neue Anhaltspunkte ergeben, die die Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf transkriptioneller Ebene, z. B. in der Differenzierung verschiedenster Unterpopulationen der T-Lymphozyten, sinnvoll erscheinen lassen.

#### **4.6 Abstract**

Für die Behandlung alkoholbezogener Krankheiten werden in Deutschland jährlich mehrere Milliarden Euro ausgegeben. Wie in zahlreichen Studien aufgezeigt, führen Alkoholkonsum als auch operativer Stress zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems. So sind postoperative Komplikationen bei alkoholkranken Patienten um das 2-5fache erhöht. Dabei gelten Pneumonien bei diesem Patientengut, sofern intensivmedizinisch betreut, als die häufigsten Komplikationen.

Genauer betrachtet zeigte sich bei chronischer Alkoholexposition eine poststimulatorische Verringerung der proinflammatorischen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6-Produktion. Auch akute Ethanol-Exposition hatte eine Verminderung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und einer Erhöhung des antiinflammatorischen IL-10 zur Folge. Nach operativen Eingriffen wurde eine posttraumatische Immunsuppression mit erniedrigten TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12- und IFN- $\gamma$ -Spiegeln und eine Erhöhung von IL-10 und IL-6 aufgezeigt. Bei alkoholkranken Patienten konnte eine unmittelbar postoperativ verminderte IL-6/IL-10-Ratio mit einer erhöhten Infektionsrate assoziiert werden.

Um die immunmodulatorischen Auswirkungen von chronischem, exzessivem Alkoholkonsum und operativem Stress gemeinsam zu untersuchen, wurden 27 Balb/c-Mäuse 8 Tage lang mit Ethanol oder isotoner Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Daraufhin erfolgte am Tag 8 die Medianlaparotomie. Am 2. postoperativen Tag erhielten die Tiere  $10^4$  CFU *Klebsiella pneumoniae* oder NaCl



intranasal. 24 Stunden post infectionem wurden die Tiere getötet und Lungen sowie Milzen als auch Blutproben wurden zur bakteriologischen Bestimmung der Keimbelastung, Proteinisolation und zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Zytokinkonzentrationen aus den Organlysaten wurden per ELISA bestimmt.

Es kam in der Gruppe der mit Ethanol vorbehandelten und postoperativ mit *K. pneumoniae* infizierten Tiere zu einem starken Anstieg des IL-6, tendenziell des IL-1 $\beta$ , des IL-10 und des TNF- $\alpha$  in den Proteinisolationen aus den Lungenparenchymlysaten. Unabhängig von der Vorbehandlung führte die postoperative Pneumonie zu einer mikrobiologisch nachgewiesenen Bakteriämie mit Erhöhungen von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-10 in den Proteinisolationen aus den Milzlysaten. Es zeigte sich zudem, dass mit Ethanol vorbehandelte Mäuse post infectionem ein deutlich schlechteres Outcome mit erhöhtem klinischen Gesamtscore und einer vermehrten Gewichtsabnahme aufwiesen. Diesen Tieren konnte ebenso eine histologisch verstärkte Entzündungsreaktion zugeschrieben werden.

Die moderat chronische Alkoholexposition führte in diesem operativen Tiermodell im Zusammenhang mit einer postoperativen Pneumonie bei den Balb/c-Mäusen zu einem schlechteren klinischen Outcome, vermehrter Gewebedestruktion und immunologischer Dysregulation mit jedoch im Vergleich zu vielen anderen Studien stark erhöhten pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen im Lungengewebe. Folgende Schlussfolgerung ergibt sich: Die intraperitoneale Gabe von Ethanol über 8 Tage hinweg führt bei Balb/c-Mäusen zu einer Kompromittierung der effizienten immunologischen Abwehr des Organismus. Dies konnte durch die Bestimmung der Gewebezytokine in Milz und Lunge während der postoperativen bakteriellen Pneumonie mit *Klebsiella pneumoniae* gezeigt werden.

## Literaturverzeichnis

1. Baker, R. C. and Jerrells, T. R. (1993): Recent developments in alcoholism:immunological aspects. *Recent Dev.Alcohol*, Band 11, Seite 249-271
2. Baumann, H. and Gauldie, J. (1994): The acute phase response. *Immunol.Today*, Band 15, Seite 74-80
3. Bekker, L. G., Freeman, S., Murray, P. J., Ryffel, B., and Kaplan, G. (2001): TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J.Immunol.*, Band 166, Seite 6728-6734
4. Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A. M., Simard, M., Olivier, M., and Bergeron, M. G. (1998): Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect.Immun.*, Band 66, Seite 912-922
5. Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., and Peterson, V. M. (1996): Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann.Surg.*, Band 224, Seite 647-664
6. Boe, D. M., Nelson, S., Zhang, P., and Bagby, G. J. (2001): Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J.Infect.Dis.*, Band 184, Seite 1134-1142
7. Carpenter, J. L. (1990): Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev.Infect.Dis.*, Band 12, Seite 672-682
8. Cook, R. T. (1998): Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 22, Seite 1927-1942
9. Cook, R. T., Garvey, M. J., Booth, B. M., Goeken, J. A., Stewart, B., and Noel, M. (1991): Activated CD-8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J.Clin.Immunol.*, Band 11, Seite 246-253
10. Cruickshank, A. M., Fraser, W. D., Burns, H. J., Van Damme, J., and Shenkin, A. (1990): Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin.Sci.(Lond)*, Band 79, Seite 161-165
11. D'Souza, N. B., Nelson, S., Summer, W. R., and Deaciuc, I. V. (1996): Alcohol modulates alveolar macrophage tumor necrosis factor-alpha, superoxide anion, and nitric oxide secretion in the rat. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 20, Seite 156-163
12. Dinarello, C. A. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, Band 87, Seite 2095-2147

13. Ehlers, S. (2003): Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann.Rheum.Dis.*, Band 62 Suppl 2, Seite ii37-ii42
14. Ewig, S. and Torres, A. (2002): Severe community-acquired pneumonia. *Curr.Opin.Crit Care*, Band 8, Seite 453-460
15. Frank, J., Witte, K., SchrodL, W., and Schutt, C. (2004): Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. *Alcohol Alcohol*, Band 39, Seite 386-392
16. Franke, G., Freihorst, J., Pfirtner, C., vd, Hardt H., and Lohmann-Matthes, M. L. (1995): Alteration of cytokine secretion and cytotoxicity of murine alveolar macrophages after in vitro infection with respiratory syncytial virus (RSV). *Adv.Exp.Med.Biol.*, Band 371B, Seite 785-790
17. Fuxench-Lopez, Z. and Ramirez-Ronda, C. H. (1978): Pharyngeal flora in ambulatory alcoholic patients: prevalence of gram-negative bacilli. *Arch.Intern.Med.*, Band 138, Seite 1815-1816
18. Giannoudis, P. V., Smith, R. M., Banks, R. E., Windsor, A. C., Dickson, R. A., and Guillou, P. J. (1998): Stimulation of inflammatory markers after blunt trauma. *Br.J.Surg.*, Band 85, Seite 986-990
19. Glaser, F., Kuntz, C., Sannwald, G. A., Mayer, H., and Herfarth, C. (1996): [General stress response in laparoscopic and conventional cholecystectomy]. *Swiss.Surg.*, Band Suppl 4, Seite 41-44
20. Greenberg, S. S., Ouyang, J., Zhao, X., Parrish, C., Nelson, S., and Giles, T. D. (1999): Effects of ethanol on neutrophil recruitment and lung host defense in nitric oxide synthase I and nitric oxide synthase II knockout mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 23, Seite 1435-1445
21. Greenberger, M. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Goodman, R. E., and Standiford, T. J. (1995): Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *J.Immunol.*, Band 155, Seite 722-729
22. Happel, K. I. and Nelson, S. (2005): Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proc.Am.Thorac.Soc.*, Band 2, Seite 428-432
23. Hessle, C., Andersson, B., and Wold, A. E. (2000): Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect.Immun.*, Band 68, Seite 3581-3586
24. Hill, D. B., Devalaraja, R., Joshi-Barve, S., Barve, S., and McClain, C. J. (1999): Antioxidants attenuate nuclear factor-kappa B activation and tumor necrosis factor-alpha production in alcoholic hepatitis patient monocytes and rat Kupffer cells, in vitro. *Clin.Biochem.*, Band 32, Seite 563-570
25. Hoche pied, T., Van Molle, W., Berger, F. G., Baumann, H., and 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, Seite 14903-14909
26. Jain-Vora, S., LeVine, A. M., Chroneos, Z., Ross, G. F., Hull, W. M., and Whitsett, J. A. (1998): Interleukin-4 enhances pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.*, Band 66, Seite 4229-4236
  27. Jong, G. M., Hsiue, T. R., Chen, C. R., Chang, H. Y., and Chen, C. W. (1995): Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest*, Band 107, Seite 214-217
  28. Jurkovich, G. J., Rivara, F. P., Gurney, J. G., Fligner, C., Ries, R., Mueller, B. A., and Copass, M. (1993): The effect of acute alcohol intoxication and chronic alcohol abuse on outcome from trauma. *JAMA*, Band 270, Seite 51-56
  29. Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M., Aono, K., and Nakashima, I. (2002): Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock. *Langenbecks Arch.Surg.*, Band 386, Seite 512-517
  30. Kamimura, S. and Tsukamoto, H. (1995): Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology*, Band 22, Seite 1304-1309
  31. Kawasaki, T., Ogata, M., Kawasaki, C., Tomihisa, T., Okamoto, K., and Shigematsu, A. (2001): Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth.Analg.*, Band 92, Seite 1322-1326
  32. Keegan, A. D. and Zamorano, J. (1998): Regulation of gene expression, growth, and cell survival by IL-4: contribution of multiple signaling pathways. *Cell Res.*, Band 8, Seite 1-13
  33. Laso, F. J., Iglesias-Osma, C., Ciudad, J., Lopez, A., Pastor, I., and Orfao, A. (1999): Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 23, Seite 1306-1311
  34. Laso, F. J., Lapena, P., Madruga, J. I., San Miguel, J. F., Orfao, A., Iglesias, M. C., and Alvarez-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, Seite 1226-1231
  35. Lee, H., Jeong, J., Son, E., Mosa, A., Cho, G. J., Choi, W. S., Ha, J. H., Kim, I. K., Lee, M. G., Kim, C. Y., and Suk, K. (2004): Ethanol selectively modulates inflammatory activation signaling of brain microglia. *J.Neuroimmunol.*, Band 156, Seite 88-95
  36. Lockhart, S. R., Abramson, M. A., Beekmann, S. E., Gallagher, G., Riedel, S., Diekema, D. J., Quinn, J. P., and 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, Seite 3352-3359

37. Lyons, A., Kelly, J. L., Rodrick, M. L., Mannick, J. A., and Lederer, J. A. (1997): Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann.Surg.*, Band 226, Seite 450-458
38. MacGregor, R. R. and Louria, D. B. (1997): Alcohol and infection. *Curr.Clin.Top.Infect.Dis.*, Band 17, Seite 291-315
39. Mandrekar, P., Catalano, D., Girouard, L., and Szabo, G. (1996): Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. *Cytokine*, Band 8, Seite 567-577
40. Martins, G. A., Da Gloria Da Costa Carvalho, and Rocha, Gattass C. (2003): Sepsis: a follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *Int.J.Mol.Med.*, Band 11, Seite 585-591
41. McClain, C. J., Hill, D. B., Song, Z., Deaciuc, I., and Barve, S. (2002): Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol*, Band 27, Seite 53-61
42. Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, Band 91, Seite 295-298
43. Menger, M. D. and Vollmar, B. (2004): Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch.Surg.*, Band 389, Seite 475-484
44. Messingham, K. A., Faunce, D. E., and Kovacs, E. J. (2002): Alcohol, injury, and cellular immunity. *Alcohol*, Band 28, Seite 137-149
45. Messingham, K. A., Heinrich, S. A., Schilling, E. M., and Kovacs, E. J. (2002): Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 26, Seite 519-526
46. Mokart, D., Capo, C., Blache, J. L., Delpero, J. R., Houvenaeghel, G., Martin, C., and Mege, J. L. (2002): Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br.J.Surg.*, Band 89, Seite 1450-1456
47. Moore, R. D., Bone, L. R., Geller, G., Mamon, J. A., Stokes, E. J., and Levine, D. M. (1989): Prevalence, detection, and treatment of alcoholism in hospitalized patients. *JAMA*, Band 261, Seite 403-407
48. Moore, T. A., Moore, B. B., Newstead, M. W., and 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, Seite 2643-2650
49. Morland, B. and Morland, H. (1989): The interaction of ethanol with human monocyte IgG-Fc receptors, characterized by monoclonal antibodies raised

- against two distinct receptor subpopulations. *Scand.J.Immunol.*, Band 29, Seite 573-577
50. Nelson, S., Bagby, G. J., Bainton, B. G., and Summer, W. R. (1989): The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J.Infect.Dis.*, Band 160, Seite 422-429
  51. Nelson, S. and Kolls, J. K. (2002): Alcohol, host defence and society. *Nat.Rev.Immunol.*, Band 2, Seite 205-209
  52. Newton, C., McHugh, S., Widen, R., Nakachi, N., Klein, T., and Friedman, H. (2000): Induction of interleukin-4 (IL-4) by legionella pneumophila infection in BALB/c mice and regulation of tumor necrosis factor alpha, IL-6, and IL-1beta. *Infect.Immun.*, Band 68, Seite 5234-5240
  53. Oberholzer, A., Oberholzer, C., and Moldawer, L. L. (2002): Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.*, Band 30, Seite S58-S63
  54. Ogata, M., Okamoto, K., Kohriyama, K., Kawasaki, T., Itoh, H., and Shigematsu, A. (2000): Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med.*, Band 28, Seite 3166-3170
  55. Omidvari, K., Casey, R., Nelson, S., Olariu, R., and Shellito, J. E. (1998): Alveolar macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in chronic alcoholics without liver disease. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 22, Seite 567-572
  56. Perez, del Pulgar, Pizcueta, P., Engel, P., and Bosch, J. (2000): Enhanced monocyte activation and hepatotoxicity in response to endotoxin in portal hypertension. *J.Hepatol.*, Band 32, Seite 25-31
  57. Podschun, R. and Ullmann, U. (1998): Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.*, Band 11, Seite 589-603
  58. Poschl, G. and Seitz, H. K. (2004): Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*, Band 39, Seite 155-165
  59. Pruitt, J. H., Copeland, E. M., III, and Moldawer, L. L. (1995): Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock*, Band 3, Seite 235-251
  60. Roach, D. R., Bean, A. G., Demangel, C., France, M. P., Briscoe, H., and Britton, W. J. (2002): TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J.Immunol.*, Band 168, Seite 4620-4627
  61. Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., and Poli, V. (1996): Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J.Exp.Med.*, Band 183, Seite 1345-1355

62. Ruiz, M., Ewig, S., Marcos, M. A., Martinez, J. A., Arancibia, F., Mensa, J., and Torres, A. (1999): Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, Band 160, Seite 397-405
63. Sander, M., Irwin, M., Sinha, P., Naumann, E., Kox, W. J., and Spies, C. D. (2002): Suppression of interleukin-6 to interleukin-10 ratio in chronic alcoholics: association with postoperative infections. *Intensive Care Med.*, Band 28, Seite 285-292
64. Saunders, B. M., Frank, A. A., Orme, I. M., and Cooper, A. M. (2000): Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect.Immun.*, Band 68, Seite 3322-3326
65. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., and Dinarello, C. A. (1990): Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, Band 75, Seite 40-47
66. Schodde, H., Hurst, S., Munroe, M., Barrett, T., and Waltenbaugh, C. (1996): Ethanol ingestion inhibits cell-mediated immune responses of unprimed T-cell receptor transgenic mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 20, Seite 890-899
67. Sewnath, M. E., Olszyna, D. P., Birjmohun, R., ten Kate, F. J., Gouma, D. J., and van der, Poll T. (2001): IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during Escherichia coli peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. *J.Immunol.*, Band 166, Seite 6323-6331
68. Sheeran, P. and Hall, G. M. (1997): Cytokines in anaesthesia. *Br.J.Anaesth.*, Band 78, Seite 201-219
69. Shellito, J. E., quan, Zheng M., Ye, P., Ruan, S., Shean, M. K., and 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, Seite 872-881
70. Song, H., Qian, Y. S., and Dong, H. M. (2005): [Effects of Klebsiella pneumoniae on the expression of cytokines by polymorphonuclear neutrophil granulocytes in mice]. *Di Yi.Jun. Yi.Da.Xue.Xue.Bao.*, Band 25, Seite 805-808
71. Song, K., Coleman, R. A., Zhu, X., Alber, C., Ballas, Z. K., Waldschmidt, T. J., and Cook, R. T. (2002): Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J.Leukoc.Biol.*, Band 72, Seite 1109-1116
72. Sonne, N. M. and Tonnesen, H. (1992): The influence of alcoholism on outcome after evacuation of subdural haematoma. *Br.J.Neurosurg.*, Band 6, Seite 125-130
73. Spies, C. D., Dubisz, N., Funk, W., Blum, S., Muller, C., Rommelspacher, H., Brummer, G., Specht, M., Hannemann, L., Striebel, H. W., and . (1995): Prophylaxis of alcohol withdrawal syndrome in alcohol-dependent patients

- admitted to the intensive care unit after tumour resection. *Br.J.Anaesth.*, Band 75, Seite 734-739
74. Spies, C. D., Kern, H., Schroder, T., Sander, M., Sepold, H., Lang, P., Stangl, K., Behrens, S., Sinha, P., Schaffartzik, W., Wernecke, K. D., Kox, W. J., and Jain, U. (2002): Myocardial ischemia and cytokine response are associated with subsequent onset of infections after noncardiac surgery. *Anesth.Analg.*, Band 95, Seite 9-18, table
  75. Spies, C. D., Neuner, B., Neumann, T., Blum, S., Muller, C., Rommelspacher, H., Rieger, A., Sanft, C., Specht, M., Hannemann, L., Striebel, H. W., and Schaffartzik, W. (1996): Intercurrent complications in chronic alcoholic men admitted to the intensive care unit following trauma. *Intensive Care Med.*, Band 22, Seite 286-293
  76. 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., and 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, Seite 649-656
  77. Spies, C. D. and Rommelspacher, H. (1999): Alcohol withdrawal in the surgical patient: prevention and treatment. *Anesth.Analg.*, Band 88, Seite 946-954
  78. Spies, C. D., Sander, M., Stangl, K., Fernandez-Sola, J., Preedy, V. R., Rubin, E., Andreasson, S., Hanna, E. Z., and Kox, W. J. (2001): Effects of alcohol on the heart. *Curr.Opin.Crit Care*, Band 7, Seite 337-343
  79. 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., and Kox, W. J. (2004): Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. *Anesthesiology*, Band 100, Seite 1088-1100
  80. Spolarics, Z., Siddiqi, M., Siegel, J. H., Garcia, Z. C., Stein, D. S., Denny, T., and Deitch, E. A. (2003): Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med.*, Band 31, Seite 1722-1729
  81. Szabo, G. (1998): Monocytes, alcohol use, and altered immunity. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 22, Seite 216S-219S
  82. Szabo, G. (1999): Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*, Band 34, Seite 830-841
  83. Szabo, G., Mandrekar, P., and Catalano, D. (1995): Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J.Leukoc.Biol.*, Band 58, Seite 342-350



84. Szabo, G., Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Catalano, D., and 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, Seite 1766-1772
85. Szabo, G., Mandrekar, P., Girouard, L., and 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, Seite 900-907
86. Szabo, G., Verma, B., and Catalano, D. (1993): Selective inhibition of antigen-specific T lymphocyte proliferation by acute ethanol exposure: the role of impaired monocyte antigen presentation capacity and mediator production. *J.Leukoc.Biol.*, Band 54, Seite 534-544
87. Tanabe, M., Matsumoto, T., Shibuya, K., Tateda, K., Miyazaki, S., Nakane, A., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. (2005): Compensatory response of IL-1 gene knockout mice after pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J.Med.Microbiol.*, Band 54, Seite 7-13
88. te Velde, A. A., Huijbens, R. J., Heije, K., de Vries, J. E., and Figdor, C. G. (1990): Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1  $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and IL-6 by human monocytes. *Blood*, Band 76, Seite 1392-1397
89. Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1994): Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, Band 83, Seite 113-118
90. Tonnesen, H., Kaiser, A. H., Nielsen, B. B., and Pedersen, A. E. (1992): Reversibility of alcohol-induced immune depression. *Br.J.Addict.*, Band 87, Seite 1025-1028
91. Tonnesen, H. and Kehlet, H. (1999): Preoperative alcoholism and postoperative morbidity. *Br.J.Surg.*, Band 86, Seite 869-874
92. Tonnesen, H., Pedersen, A., Jensen, M. R., Moller, A., and Madsen, J. C. (1991): Ankle fractures and alcoholism. The influence of alcoholism on morbidity after malleolar fractures. *J.Bone Joint Surg.Br.*, Band 73, Seite 511-513
93. Tonnesen, H., Schutten, B. T., and Jorgensen, B. B. (1987): Influence of alcohol on morbidity after colonic surgery. *Dis.Colon Rectum*, Band 30, Seite 549-551
94. Tonnesen, H., Schutten, B. T., Tollund, L., Hasselqvist, P., and Klintorp, S. (1988): Influence of alcoholism on morbidity after transurethral prostatectomy. *Scand.J.Urol.Nephrol.*, Band 22, Seite 175-177
95. Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G. E., Bradford, B. U., Wheeler, M. D., Gabele, E., Isayama, F., and Thurman, R. G. (2002): Role of lipopolysaccharide-binding

- protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J.Immunol.*, Band 168, Seite 2963-2969
96. Ulich, T. R., Yin, S., Guo, K., Yi, E. S., Remick, D., and del Castillo, J. (1991): Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am.J.Pathol.*, Band 138, Seite 1097-1101
  97. Ulich, T. R., Yin, S. M., Guo, K. Z., del Castillo, J., Eisenberg, S. P., and Thompson, R. C. (1991): The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation. *Am.J.Pathol.*, Band 138, Seite 521-524
  98. van der, Poll T., Marchant, A., Keogh, C. V., Goldman, M., and Lowry, S. F. (1996): Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J.Infect.Dis.*, Band 174, Seite 994-1000
  99. van Dissel, J. T., van Langevelde, P., Westendorp, R. G., Kwappenberg, K., and Frolich, M. (1998): Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*, Band 351, Seite 950-953
  100. Verma, B. K., Fogarasi, M., and Szabo, G. (1993): Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. *J.Clin.Immunol.*, Band 13, Seite 8-22
  101. Volk, H. D. (2002): Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*, Band 6, Seite 279-281
  102. von Heymann, C., Langenkamp, J., Dubisz, N., von, Dossow, V, Schaffartzik, W., Kern, H., Kox, W. J., and Spies, C. (2002): Posttraumatic immune modulation in chronic alcoholics is associated with multiple organ dysfunction syndrome. *J.Trauma*, Band 52, Seite 95-103
  103. Waltenbaugh, C., Vasquez, K., and Peterson, J. D. (1998): Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 22, Seite 220S-223S
  104. Wang, M., Jeng, K. C., and Ping, L. I. (1999): Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with Klebsiella infection. *Immunology*, Band 98, Seite 90-97
  105. Wang, Y., Huang, D. S., Giger, P. T., and Watson, R. R. (1994): Influence of chronic dietary ethanol on cytokine production by murine splenocytes and thymocytes. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 18, Seite 64-70
  106. Winterbauer, R. H., Bedon, G. A., and Ball, W. C., Jr. (1969): Recurrent pneumonia. Predisposing illness and clinical patterns in 158 patients. *Ann.Intern.Med.*, Band 70, Seite 689-700
  107. World Health Organisation : Global Status Report on Alcohol 2004.

108. Wu, C. L., Lee, Y. L., Chang, K. M., Chang, G. C., King, S. L., Chiang, C. D., and Niederman, M. S. (2003): Bronchoalveolar interleukin-1 beta: a marker of bacterial burden in mechanically ventilated patients with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med.*, Band 31, Seite 812-817
109. Zellweger, R., Ayala, A., Zhu, X. L., Morrison, M. H., and Chaudry, I. H. (1995): Effect of surgical trauma on splenocyte and peritoneal macrophage immune function. *J.Trauma*, Band 39, Seite 645-650
110. Zhang, P., Bagby, G. J., Boe, D. M., Zhong, Q., Schwarzenberger, P., Kolls, J. K., Summer, W. R., and Nelson, S. (2002): Acute alcohol intoxication suppresses the CXC chemokine response during endotoxemia. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, Band 26, Seite 65-73
111. Zuckerman, S. H., Evans, G. F., and Butler, L. D. (1991): Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect.Immun.*, Band 59, Seite 2774-2780

## Anhang

### **Abbildungs- und Bildverzeichnis**

Abbildung 1	Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzlysate .....	38
Abbildung 2	Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate .....	40
Abbildung 3	Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate .....	41
Abbildung 4	Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate .....	42
Abbildung 5	Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate .....	44
Abbildung 6	Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate .....	45
Abbildung 7	Messung der IL-10-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate .....	46
Abbildung 8	Messung der IL-10-Konzentration mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate .....	47
Abbildung 9	Messung der IL-4 Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Milzhomolysate .....	49
Abbildung 10	Messung der IL-4-Konzentrationen mittels ELISA aus den Überständen der Lungenhomolysate .....	51
Abbildung 11	Messung der Keimbelastung der infizierten Lungen 24 Stunden nach Infektion durch Ausstreichen von Verdünnungsreihen homogenisierter Lungen, angegeben in CFU/ml .....	54
Abbildung 12	Gewichtsabnahme zwischen 1. Behandlungstag und 3. postoperativen Tag .....	57
Abbildung 13	Gewichtsabnahme in Korrelation mit dem Score erhoben am Tag der Tötung .....	58

---

Bild 1	40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2847) .....	52
Bild 2	200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2847) .....	52
Bild 3	40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2845) .....	52
Bild 4	200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe EtOH+Klebsiellen (Präparat M2845) .....	52
Bild 5	40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2817) .....	53
Bild 6	200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2817) .....	53
Bild 7	40fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2818) .....	53
Bild 8	200fache Vergrößerung des Lungenparenchyms der Versuchsgruppe NaCl+Klebsiellen (Präparat M2818) .....	53

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Darstellung der gruppenspezifischen Verfahrensweise .....	27
Tabelle 2	Kriterien für den klinischen Score und deren Wichtigung .....	29
Tabelle 3	Mediane der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Anzahl der Tiere und Angabe der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	38
Tabelle 4	Mediane der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	40
Tabelle 5	Mediane der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	41
Tabelle 6	Mediane der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	43
Tabelle 7	Mediane der IL-6-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	44
Tabelle 8	Mediane der IL-6-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	45
Tabelle 9	Mediane der IL-10-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	46
Tabelle 10	Mediane der IL-10-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	48
Tabelle 11	Mediane der IL-4-Konzentrationen in den Milzhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	49
Tabelle 12	Mediane der IL-4-Konzentrationen in den Lungenhomolysaten der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	51
Tabelle 13	Medianwerte der Klebsiellenkonzentrationen in den Lungen der beiden untersuchten Gruppen .....	54

---

Tabelle 14	Mediane Ethanolkonzentrationen im Blut der gemessenen Tiere 1 Stunde nach Verabreichung von 3g Ethanol/Kilogramm ...	56
Tabelle 15	Mediane der Gewichtsabnahmen der einzelnen Gruppen mit Angabe der Anzahl der Tiere und der Signifikanzen in den getätigten Gruppenvergleichen.....	57

## ***Lebenslauf***

Der Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version der Doktorarbeit nicht veröffentlicht.



## ***Danksagung***

Besonders dankbar bin ich Frau Prof. Dr. med. Spies, Klinikdirektorin der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum und Campus Charité Mitte für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, die Schaffung der optimalen Rahmenbedingungen, die Idee und Vorbereitung sowie Umsetzung des tierexperimentellen Antrages und die kritische Durchsicht dieser Dissertationsschrift.

Für die aufopferungsvolle Betreuung während der Experimente als auch in der Schreibphase möchte ich Nadine Lanzke ganz herzlich danken. Mit Engagement, moralischer Unterstützung und Ihrem umfangreichen Wissen war sie maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt.

Für die Möglichkeit in den verschiedenen Laboratorien der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums, des Robert-Koch-Institutes, sowie im Institut für Laboratoriumsdiagnostik und Pathobiochemie zu arbeiten möchte ich PD Dr. Große-Siestrup, Prof. Dr. Appel und Fr. Dr. Ziemer danken. Für die große Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und den Laborarbeiten gilt in diesem Zusammenhang Rico Böhme und Frau Egerer sowie den Tierpflegern und -pflegerinnen für die liebevolle Versorgung der Versuchstiere mein besonderer Dank.

Für die viele Zeit, die anregenden fachlichen Diskussionen und den Spaß am wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Anett Neumann, Carlotta Pipolo, Lilit Sargsyan und Moritz von Mettenheim bedanken.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mir das Studium ermöglichte und es verstand, mir während der gesamten Zeit der Doktorarbeit Motivation und Durchhaltevermögen zu vermitteln und den Rücken zu stärken.

***Erklärung an Eides statt***

Ich, Steffen Mühlbauer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von Ethanol auf die Zytokinkonzentrationen in Milz und Lunge während einer postoperativen Pneumonie im 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.