

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

DISSERTATION

**Einfluss von chronischem Alkoholkonsum auf die Funktion
der Alveolarmakrophagen bei Panendoskopiepatienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Johannes Tobias Thiel

aus Potsdam

Datum der Promotion: 02.03.2018

Vorwort

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Berger K, Sander M, Meisel C, Menk M, Paschen C, Olze H, Spies C

„ALMOs in patients with AUD“

Deutscher Suchtkongress Mannheim, 2008

Thiel JT, Berger K, Bast F, Sedlmaier B, Spies C, Meisel C, Sander M

„Einfluss von chronischem Alkoholabusus auf die pulmonale Immunabwehr“

Anästh. Intensivmed 50 (Suppl. 4):624, 2009

Thiel JT, Berger K, Bast F,

„Patients with chronic alcohol consumption undergoing panendoscopic surgery have altered cytokine levels in the lung“

Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Berlin, 2011

Chalk K, Thiel JT, Bast F, Sander M

“Alcohol and cigarette smoke have negative affect on alveolar macrophages“

Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism, San Francisco, 2012

Teilergebnisse dieser Arbeit werden zur Veröffentlichung eingereicht:

Chalk K, Thiel JT, Meisel C, Spies C, Wernecke KD, Sander M

Drinking and Smoking – dangerous cocktail for alveolar macrophages? – a pilot study

ACER – Alcoholism: Clinical and Experimental Research

Wissenschaftliche Preise:

Thiel JT, Berger K, Bast F, Sedlmaier B, Spies C, Meisel C, Sander M

„Einfluss von chronischem Alkoholabusus auf die pulmonale Immunabwehr“

3. Vortragspreis, Berlin, 2009

Für meine Tochter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis:	VII
Abstrakt	1
Einleitung	1
Methodik.....	1
Ergebnisse	1
Schlussfolgerung.....	1
Abstract	2
Purpose	2
Methods	2
Results	2
Conclusion	2
1. Einleitung	3
1.1 Allgemeines und Historisches.....	3
1.2 Klinische Relevanz.....	3
1.3 Alkohol und die Lunge	5
1.4 Einfluss von Alkohol auf Alveolarmakrophagen.....	6
1.4.1 Alkohol und die HLA-DR-Expression auf Alveolarmakrophagen.....	7
1.4.2 Toll-like-Rezeptor 2, 4 und Alkohol.....	7
1.4.3 Alkohol und das Zytokinnetzwerk	8
1.4.3.1 IL-1 β	9
1.4.3.2 IL-6	10
1.4.3.3 TNF- α	10
1.4.3.4 IL-8	11
1.4.3.5 IL-10	11
1.4.3.6 IL-12(p70).....	12
1.4.4 Effekte von Nikotin auf die Alveolarmakrophagen	12
2. Fragestellung	13
3. Material und Methodik.....	14

3.1	Studiendesign	14
3.2	Ein- und Ausschlusskriterien.....	14
3.2.1	Einschlusskriterien.....	14
3.2.2	Ausschlusskriterien	14
3.3	Gruppeneinteilung.....	15
3.3.1	AUDIT-Fragenkatalog	15
3.3.2	CAGE-Fragenkatalog	16
3.3.3	Laborparameter und Anamnese	17
3.4	Studienprotokoll	17
3.4.1	Überblick.....	17
3.4.2	Durchflusszytometrie	18
3.4.3	Isolierung der Alveolarmakrophagen	19
3.4.4	Aufbereitung der BALF und Bestimmung der Zellzahl.....	20
3.4.5	HLA-DR aus BALF.....	21
3.4.6	Bestimmung von TLR-2 und TLR-4	22
3.4.7	LPS-Stimulation der AM	23
3.4.8	Messungen der Zytokine	24
3.5	Statistik.....	25
4.	Ergebnisse.....	26
4.1	Basischarakteristika	26
4.2	Einfluss von AUD auf die Funktion von AM	29
4.2.1	HLA-DR, TLR-2 und -4 auf Makrophagen in BALF	29
4.2.2	Zytokinbestimmungen.....	30
4.2.2.1	Zytokine in BALF ohne Stimulation und Inkubation	30
4.2.2.2	Zytokine in BALF nach 4h LPS-Stimulation	31
4.2.2.3	Zytokine in BAL nach 24h LPS Stimulation.....	33
4.3	Einfluss von Zigarettenrauch auf die Funktion der AM	34
4.3.1	Raucher nAUD (B) vs. Raucher AUD (D)	35
4.3.2	Nichtraucher nAUD (A) vs. Raucher nAUD (B)	38
4.3.3	Nichtraucher nAUD (A) vs. Nichtraucher AUD (C).....	41
5.	Diskussion.....	47
5.1	HLA-DR, TLR-2, TLR-4 und Alkohol.....	47
5.2	Zytokine und chronischer Alkoholkonsum	49

5.2.1	Interleukin-1 β	50
5.2.2	IL-6.....	51
5.2.3	TNF- α	51
5.2.4	IL-8.....	53
5.2.5	IL-10.....	54
5.2.6	IL-12p70.....	55
5.3	Effekte von Nikotin auf Immunparameter.....	56
5.3.1	HLA-DR, TLR 2, TLR 4 und Zigarettenrauch.....	56
5.3.2	Zytokine und Zigarettenrauch.....	57
5.4	Limitationen der Studie.....	58
5.4.1	Patientenkollektiv.....	58
5.4.2	Methodikdiskussion.....	59
5.4.2.1	Bronchoalveoläre Lavage.....	59
5.4.2.2	Durchflusszytometrie.....	59
5.4.2.3	Interpretation von Zytokinen und deren Adhäsionsmolekülen.....	60
5.5	Schlussfolgerung.....	62
	Eidesstattliche Versicherung.....	65
	Literaturverzeichnis:.....	66
	Anhang.....	74
	Abbildungsverzeichnis:.....	74
	Tabellenverzeichnis:.....	75
	Lebenslauf.....	76
	Danksagung.....	78

Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
AM	Alveolarmakrophage(n)
AUD	Alkoholbezogene Störungen (alcohol use disorder)
AUDIT	Alcohol Use Disorder Identification Test
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
CCM	Charité Campus Mitte
CDT	Carbohydrate Deficient Transferrin
CVK	Charité Campus Virchow Klinikum
Child B	Child-Pugh-Score Grad b
CI	Konfidenzintervall
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Diff	Differentialzellbild Leukozyten
DSM	Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen
EtOH	Alkohol
FACS	Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
FiO ₂	Fraction of Inspired Oxygen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein - 1
MCV	Mean Corpuscular Volume

MI	Mitralklappeninsuffizienz
mRNA	Messenger ribonucleidacid
nAUD	Nicht Alkoholbezogene Störungen
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Leukozytenkulturmedium)
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Seitwärtsstreulicht
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VB	Vollblut
WHO	World Health Organization

Abstrakt

Einleitung

Neben den postoperativen Pneumonien und ARDS machen perioperativ die pulmonalen Komplikationen den größten Teil bei den alkoholassoziierten Komplikationen aus. Eine überragende Rolle in der pulmonalen Immunabwehr nehmen dabei die Alveolarmakrophagen ein. Um den Einfluss auf die lokale Immunabwehr in der Lunge von Alkoholikern besser verstehen zu können, charakterisierten wir erstmals *ex vivo* die Funktion der Alveolarmakrophagen bei *chronischem* Alkoholkonsum aus der BAL bei Panendoskopiepatienten.

Methodik

Von insgesamt 46 Patienten wurden aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei elektiver Panendoskopie die Alveolarmakrophagen asserviert. Anschließend wurden die HLA-DR-Expression, die TLR2- und TLR4-Expression sowie die Konzentration von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ohne und nach Lipopolysaccharid (LPS) Stimulation gemessen. Insgesamt 15 Patienten konnten der Alkoholgruppe zugeteilt (AUD) werden, die Kontrollgruppe (nAUD) bestand aus 31 Patienten.

Ergebnisse

Die unstimulierten Messungen der Zytokine ergab erhöhte Signifikanzen in der AUD-Gruppe für IL-10, IL-12p70 und IL-1 β . Nach LPS-Stimulation war die IL-10 Konzentration noch signifikant erhöht, während dem gegenüber TNF- α und IL-8 in der AUD-Gruppe signifikant erniedrigt waren. Bei der HLA-DR, sowie den TLR-Expressionen auf den AM konnten keine signifikanten Differenzen der beiden Gruppen gefunden werden.

Schlussfolgerung

Chronischer Alkoholkonsum kann das Zytokinprofil in der Lunge in zweierlei Hinsicht modifizieren. Zum einen wird teilweise das ursprüngliche Gleichgewicht der Zytokinkonzentration verändert. Zum anderen kann die Kapazität der Zytokinproduktion nach Pathogenkontakt, also die Fähigkeit auf Mikroorganismen zu reagieren, ebenso verändert werden. Dies könnte die erhöhte Ausgangsbereitschaft zu pulmonalen Infekten in der Lunge von chronischen Alkoholabusikern erklären und die im Verlauf einer Infektion erhöhte Mortalität und protrahierte Rekonvaleszenz.

Abstract

Purpose

Alveolar macrophages (AM) are the first barrier against respiratory pathogens in the lung. In addition to phagocytic properties, AMs also activate other immune cells by antigen presentation via HLA-DR or antigen recognition via TLR receptors. Patients with alcohol use disorder (AUD) have higher risks for perioperative pulmonary complications. To gain more insight on modulation of the AM function we sought to characterize the influence of alcohol on HLA-DR and TLR-2/-4 expression, cytokine levels as well as the capacity of cytokine production after LPS stimulation.

Methods

46 patients undergoing elective panendoscopic surgery were included in this observational pilot study. We were able to include 31 non-AUD (nAUD) and 15 AUD patients with a daily alcohol use of over 60g. HLA-DR and TLR-2/-4 expression and cytokine production were assessed by flow cytometer.

Results

The BALF of all AUD patients showed without LPS stimulation significant higher IL-1 β , IL-10 and IL12p70 cytokine levels. After LPS stimulation IL-10 was also increased, therefore IL-8 and TNF- α levels were depressed. HLA-DR and the expression of TLR-2/-4 were not significantly impaired.

Conclusion

Chronic alcohol abuse leads to an inflammation in the bronchoalveolar space, with elevated cytokine levels and an impaired AM function to react to LPS. To understand the underlying pathways further investigation will be necessary.

1. Einleitung

1.1 Allgemeines und Historisches

Seit Mesopotamien ist Alkohol die am häufigsten missbrauchte Substanz weltweit und ein systemisch wirkendes Toxin mit einer sehr geringen therapeutischen Breite - mit massiven Folgen für Gesellschaft und Gesundheit [1-3]. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Robert Koch während den damals grassierenden Cholera-Epidemien einen positiven Zusammenhang zwischen hohem Alkoholkonsum und einer allgemeinen Immunsuppression [2]. Der Mediziner und Mikrobiologe beschrieb 1884 eine signifikant gestiegene Mortalität von starken Alkoholikern unter den Infizierten gegenüber Nichtalkoholikern [2]. Inzwischen, Anfang des 21. Jahrhunderts, ist durch zahlreiche Studien belegt, dass Alkohol mit einer großen Menge an Zellen und Molekülen des angeborenen und erworbenen Immunsystems und deren Signalwege interagiert und damit ein wichtiges immunmodulatorisches Agens darstellt [2, 4-12]. Alkohol und dessen Metabolite können nahezu alle Organsysteme schädigen oder zumindest deren Funktion beeinflussen und sind assoziiert mit der Entstehung von malignen Tumoren [12-26]. Im Jahr 2013 trank durchschnittlich jeder Deutsche 9,7 Liter Reinalkohol [27]. Andere Quellen gehen sogar von bis zu 12,3 Liter Reinalkohol pro Jahr und Kopf aus [28]. Insgesamt weisen 5,9 Millionen Deutsche (11,4% der Gesamtbevölkerung) eine 12-Monats-Prävalenz für gesundheitsgefährdendes Trinkverhalten auf [29]. Nach Definition der WHO wird dabei eine Grenze von mehr als 20 g/d (\cong 0,5 Liter Bier pro Tag) für Frauen bzw. 30 g/d für Männer an Reinalkohol als riskanter Konsum angenommen [30]. Bis zu 74.000 Bundesbürger sterben jährlich an den Folgen von Alkoholmissbrauch; 20-mal mehr als im Straßenverkehr. Die resultierenden volkswirtschaftlichen Kosten alkoholbezogener Erkrankungen belaufen sich schätzungsweise pro Jahr auf rund 20 Milliarden Euro allein in Deutschland [31, 32].

1.2 Klinische Relevanz

Neben der monetären Belastung für die sozialen Sicherungssysteme haben Patienten mit chronischem Alkoholabusus vor allen Dingen in der operativen Medizin und im intensivstationären Setting eine hohe Relevanz und stellen eine große medizinische Herausforderung für den behandelnden Arzt dar [30]. Jeder 5. Patient, der eine Klinik

betritt, betreibt chronisch gesundheitsgefährdenden Alkoholkonsum [14, 22, 30]. Langwieriger Alkoholabusus wird mit über 200 Krankheiten kausal in Verbindung gebracht [21, 28]. So gehen schätzungsweise 50% aller Leberschäden und chronischen Pankreatitiden auf chronischen Alkoholkonsum zurück [30]. Prolongierter Alkoholmissbrauch ist weltweit für 3,6% der Krebsfälle verantwortlich [21]. Und mehr als die Hälfte der Fälle von dilatativer Myopathie unklarer Genese sind durch chronische Einnahme von Alkohol bedingt [14, 23, 30].

Gut untersucht ist auch der Einfluss von Alkohol auf den peri- und postoperativen Krankheitsverlauf von Patienten im Krankenhaus. Tonnesen et al. berichten, dass schädlicher Alkoholkonsum die postoperative Morbidität bei sämtlichen operativen Eingriffen bis auf ein dreifaches erhöht [13, 33]. Blutungskomplikationen sind in der perioperativen Phase doppelt so häufig [30]. Alkoholiker, die auf der Intensivstation behandelt werden, sterben in bis zu 50% der Fälle und verbleiben nach Tumorresektionen im oberen Verdauungstrakt signifikant länger auf Intensivstation als Nichtalkoholiker [33, 34]. Patienten mit chronischem Alkoholkonsum haben ein erhöhtes Risiko, mechanisch beatmet werden zu müssen [35]. Ein Alkoholentzugssyndrom tritt bei bis zu 25% der intensivmedizinischen Patienten nach Reduktion der Analgosedierung auf und führt zu Störungen der Hämodynamik [23, 30]. Nicht nur die Gefahr ein Trauma zu erleiden ist unter Alkoholeinfluss erhöht, sondern auch das assoziierte Ausmaß der Immunschädigung und die Rekonvaleszenz der hospitalisierten Traumapatienten werden durch EtOH-Intoxikation wesentlich negativ beeinflusst [2, 5, 36, 37]. Alkoholiker müssen insgesamt häufiger chirurgisch revidiert werden und verbleiben durchschnittlich signifikant länger im Krankenhaus [23].

Der größte Teil an postoperativen Komplikationen bei Alkoholikern wird durch nosokomiale Infektionen verursacht [13]. Chronischer Alkoholkonsum führt wohl über die veränderte Immunabwehr zu signifikant häufigeren Infektionen mit hoch virulenten Erregern bis hin zur Sepsis [4, 5, 10, 11, 38-41]. Die dabei häufigste und gut untersuchte Infektionserkrankung bei chronischen Alkoholkonsumenten ist die nosokomial erworbene Pneumonie - hervorgerufen durch *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumoniae* und andere gramnegative Organismen [2, 10, 24, 38]. Robert T. Cook et al. führten 1998 in einer Metaanalyse auf, dass in mehreren klinischen Studien die Erkrankungsrate von Alkoholikern an bakteriellen

Pneumonien signifikant höher war [10]. Schlussendlich entwickeln mehr als ein Drittel (38%) aller Langzeittrinker eine Lungenentzündung nach Operationen [25, 34, 42]. Die Inzidenzratio für Pneumonien ist für Alkoholiker drei- bis vierfach erhöht gegenüber Nichtalkoholikern [42]. Zudem lässt sich retrospektiv bei 25-50% aller in die Klinik eingelieferten Patienten mit Pneumonie eine Alkoholabhängigkeit ausmachen [43]. Alkoholmissbrauch erhöht das Risiko für ARDS um den Faktor drei bis vier, unabhängig von der Erkrankungsschwere, von Leberschäden und anderen Faktoren die mit Alkoholabusus in Verbindung stehen [1, 44]. Moss et al. zeigten erstmals 1996 in einer epidemiologischen Studie an 351 intensivpflichtigen Patienten, dass in mehr als 50% aller Fälle von ARDS eine chronische Alkoholergangenheit auszumachen ist [7]. Die alkoholgetriggerte Pneumonie ist dabei mit oder ohne Sepsis ein großer Risikofaktor für ARDS [1, 43]. Neben den postoperativen Pneumonien und ARDS machen auch perioperativ die pulmonalen Komplikationen den größten Teil bei den alkoholassoziierten Komplikationen aus [24].

1.3 Alkohol und die Lunge

Alkohol wirkt systemisch über den kleinen und großen Kreislauf in allen Geweben und

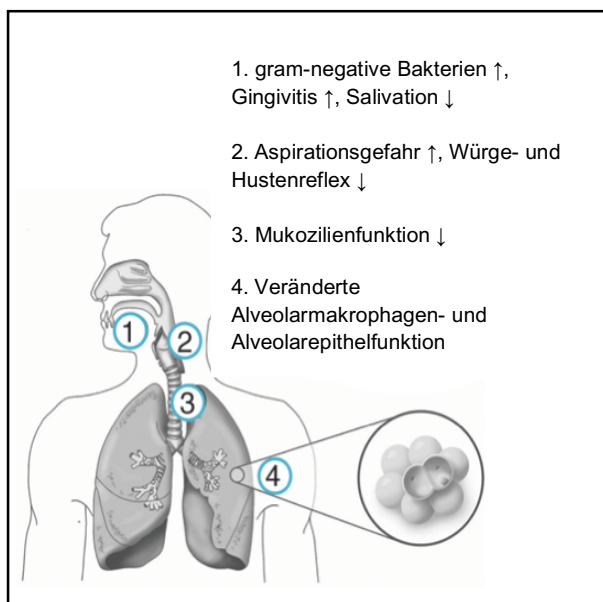


Abbildung 1: Effekte von Alkohol auf den Respirationstrakt

Flüssigkeiten des Körpers, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär [28]. Die Lunge erreicht EtOH sowohl über den bronchialen Kreislauf als auch zusätzlich per Inhalationen während des Trinkens [15]. Im pulmonalen Kompartiment wird Alkohol zwar teilweise metabolisiert und eliminiert, nichtsdestotrotz sind bislang einige Störungen und Veränderungen von Gewebe durch EtOH auf dem Weg vom Mund zum Alveolus bekannt (Abbildung 1) [2, 11, 28]. Gut untersucht ist die reduzierte mukoziliäre Funktion und die damit verminderte mukoziliäre Clearance durch

das respiratorische Epithel. Die mukoziliäre Clearance ist der wichtigste Mechanismus gegen Pathogene in der Trachea und den ableitenden Atemwegen [1]. Chronische

Alkoholexposition verursacht über second-messenger-Kaskaden eine Abnahme der mukoziliären Schlagfrequenz und damit der Clearance bei simultaner Desensibilisierung der Zilien auf frequenzerhöhende Stimuli [24]. Erhöhte Aspirationsgefahr durch neurogenvermittelten oder bewusstseinsgestörten Würge- und Hustenreiz sowie vermehrt pathogene Keime in der Mundflora bei reduzierter Speichelsekretion sind weitere negative Folgen für den oberen Atem- bzw. Verdauungstrakt [9]. In deren Folge können sich potentielle Krankheitserreger sowie inhalierte Partikel effektiver in der Lunge absiedeln und fordern die lokale Abwehr der Lunge in hohem Maße heraus.

1.4 Einfluss von Alkohol auf Alveolarmakrophagen

Eine überragende Rolle in der angeborenen pulmonalen Immunabwehr nehmen die

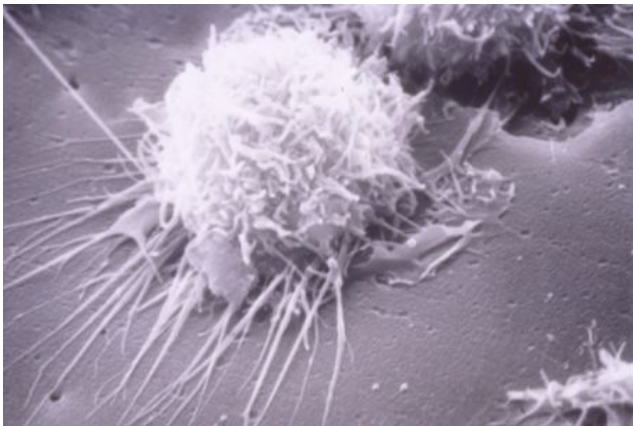


Abbildung 2: Alveolarmakrophage in einem Alveolus

Alveolarmakrophagen (AM) ein. 85%-95% aller Zellen im Alveolarraum, gewonnen mittels bronchoalveolärer Lavage, sind AM und haben als erste unspezifische Barriere eine übergeordnete Funktion inne [26, 45, 46]. Unter normalen Bedingungen findet sich in jeder Alveole mindestens eine Alveolarmakrophage [26]. Als in der Anzahl dominierende Phagozyten ist es die Aufgabe der AM, Bakterien, Viren und

inhalierte Partikel im Luftraum zu detektieren und abzutöten, um die Sterilität der Lunge zu wahren [9]. Der Kontakt mit Pathogenen induziert die Produktion von Zytokinen durch die AM, um eine Immunantwort und Entzündungsreaktion zu initiieren und aufrecht zu halten [5, 47, 48]. Außerdem können so Lymphozyten und Neutrophile angelockt werden [49]. Die wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine sind dabei $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6 [5, 47]. Exzessive Level dieser Zytokine verursachen möglicherweise Gewebeschäden, während zu niedrige Werte in einer insuffizienten Immunantwort resultieren können [5]. Des Weiteren haben AM eine Ausnahmestellung in der Produktionskapazität von lytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies [50, 51]. Diese helfen, aufgenommene Mikroorganismen abzutöten [52]. Es gibt mittlerweile hinreichende Evidenz, dass den durch Alkohol veränderten AM eine gewichtige Rolle bei

Lungenentzündungen- und versagen zuteilwird [1, 9, 43, 50, 53-55]. Wie genau die Funktion der AM durch Alkohol verändert wird, ist bis heute nicht vollständig verstanden [56].

1.4.1 Alkohol und die HLA-DR-Expression auf Alveolarmakrophagen

HLA-DR ist ein glykolysiertes Membranprotein, welches essentiell für die Antigenprozessierung- und präsentation auf B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie den Alveolarmakrophagen, ist. Über 90% der normalen Alveolarmakrophagen in der Lunge exprimieren HLA-DR [57]. Die Funktion von HLA-DR besteht darin, prozessierte Antigene an CD4-positive T-Zellen zu präsentieren, um darüber die spezifische Immunantwort einzuleiten und potentielle Pathogene wirksam zu eliminieren [58]. Ein Zusammenhang von erhöhter HLA-DR-Expressionsdichte auf der Oberfläche von Monozyten bei Infektionen, Traumen und Verbrennungen aber auch bei Erkrankungen wie Tuberkulose, Systemischer Lupus erythematodes (SLE) oder Morbus Hodgkin ist hinlänglich bekannt [59, 60]. HLA-DR ist ein guter Prädiktor für die Entstehung und das Outcome von posttraumatischen Infektionen [58, 61]. In der Lunge konnten bei Patienten mit extrinsischer allergischer Alveolitis, idiopathischer Lungenfibrose, Sarkoidose, rheumatoider Lungenkrankheit und pulmonalen Infektionen eine erhöhte Dichte an HLA-DR-Antigenexpression auf den AM aus der BAL gegenüber der lungengesunden Kontrollgruppe festgestellt werden [60]. Eine weitere Studie konnte eine verringerte HLA-DR-Expression auf AM bei Pneumoniepatienten messen, nicht aber bei der COPD und interstitiellen Lungenerkrankungen [62]. Außerdem ist bei Rauchern sowohl die Anzahl an HLA-DR exprimierenden AM reduziert, als auch die Dichte der Expression auf den AM [63, 64]. Zur Quantität der HLA-DR-Expression auf den Alveolarmakrophagen bei chronischem Alkoholabusus im Vergleich zu Nichttrinkern konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden.

1.4.2 Toll-like-Rezeptor 2, 4 und Alkohol

Alveolarmakrophagen erkennen Erreger durch ihre Wechselwirkung mit Rezeptoren der eigenen Zelloberfläche, einschließlich einer Familie von Rezeptoren, bekannt als Toll-

like-Rezeptoren (TLR) [9]. Bereits zehn Toll-like-Rezeptoren sind beim Menschen und 13 in Mäusen identifiziert worden [65, 66]. Die transmembranen TLR-Proteine 2 und 4 können mit einer Vielzahl von Molekülstrukturen (LPS, Flagellin, virale DNA) von Viren und Bakterien interagieren. Dies führt zu einer Inflammationsreaktion des Wirts mit erhöhter Zytokininduktion von TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-12, antiviraler Antwort und Reifung von dendritischen Zellen mit dem Ziel, die Pathogene zu eradizieren [66]. Das Lipopolysaccharid (LPS) der gramnegativen Bakterien wird zum Beispiel über TLR-4 erkannt [66]. TLR-2 im Zusammenspiel mit TLR-1 oder TLR-6 erkennt und kommuniziert mit verschiedenen Komponenten von grampositiven Bakterien und Zellwandbestandteilen des Mykobakteriums [66, 67]. 2006 veröffentlichte *in vivo* und *in vitro* Studien suggerieren, dass durch EtOH veränderte Zytokinwerte über den TLR-Signalweg zustande kommen [53]. Oak et al. konnten zeigen, dass *akute* Alkoholeinnahme die TLR-4 induzierte TNF- α -Produktion nach LPS-Stimulation durch Monozyten signifikant verminderte, während über TLR-2 TNF- α nicht vermindert wurde. Interessanterweise konnte *akuter* Alkohol über die Präsenz beider Costimulatoren (TLR-2, TLR-4) auf Monozyten TNF- α erhöhen. Für IL-10 konnte genau das Gegenteil via TLR-2 und -4 Signalweg nachgewiesen werden [67, 68].

Eine jüngere Studie aus dem Jahr 2010 konnte zeigen, dass Alkohol im Alveolarepithel einer humanen Zelllinie TLR-2 hochreguliert [69]. TLR-4 kommt auf den AM eine Hauptrolle beim Interagieren und eliminieren des Respiratory Syncytial Virus´ (RSV) zugute. TLR-4 defiziente Mäuse exprimierten weniger pro-inflammatorische Zytokine und brauchten länger bis zur Ausheilung der RSV-Infektion [70]. Bei TLR-4 Knockout Mäusen unter *akutem* Alkoholeinfluss und mit gleichzeitig zugefügten Brandverletzungen wurden signifikant weniger Neutrophile in der Lunge festgestellt. Sowohl die systemische als auch die pulmonale Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF- α) waren in diesem tierexperimentellen Modell erniedrigt gegenüber den gesunden Mäusen [71].

1.4.3 Alkohol und das Zytokinnetzwerk

Zytokine gehören zu einer Klasse von multifunktionalen Proteinen, welche in die zelluläre Kommunikation und Aktivierung des Immunsystems involviert sind [26, 48, 68, 72-74]. Zytokine können grundsätzlich in pro-inflammatorisch (Th1) oder anti-inflammatorisch (Th2) eingeteilt werden, abhängig von ihrer Rolle im Immunsystem [72].

Allgemein induzieren Th1-Zytokine wiederum pro-inflammatorische Zytokine während diese Th2-Zytokine inhibieren und vice versa. In einer Vielzahl an Studien konnte gezeigt werden, dass Zytokinlevel von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oder MCP-1 in verschiedenen Gewebeformen wie Plasma, Lunge, Leber und Gehirn durch Alkoholkonsum verändert werden [72, 75]. Eine Vielzahl von Faktoren ist an der angeborenen Immunantwort in der Lunge beteiligt. Zytokine bilden dabei aber die größte und pleiotropeste Gruppe an Mediatoren [48]. Zusammen mit löslichen Faktoren und Molekülen der Zelloberfläche sind Zytokine in das Erkennen von Mikroben, der Rekrutierung von Leukozyten und der Beseitigung der eingedrungenen Mikroorganismen involviert. Die in bisherigen Studien akkumulierten Daten vermitteln gute Belege, dass durch die Erforschung des Einflusses von Alkohol auf das Zytokinnetzwerk das Verständnis um die schädliche Wirkung von EtOH erhöht wird [68, 76]. Dennoch sind die bisherigen Ergebnisse zu stark divergierend, um ein akzeptables Modell von allgemeingültigen Mechanismen konstruieren zu können, in welcher Weise Alkohol die Zytokine und damit die Immunabwehr beeinflusst [68, 76]. Vor allen Dingen die teilweise unüberschaubaren, nicht monokausalen Interaktions-, Induktions- und Suppressionssignalwege der Zytokine, den zugehörigen löslichen und membrangebundenen Rezeptoren und weitere Faktoren müssen weiterhin erforscht werden [68, 72]. Das Potential von Zytokinen als diagnostische Marker aber auch als Schnittstellen von potentiellen Therapiestrategien herauszuarbeiten und klinisch zu erproben, ist Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung. Gerade bei der Entstehung der sehr häufigen pulmonalen Erkrankungen bei hospitalisierten Alkoholikern steht das Verständnis der immunologischen Zusammenhänge in der Lunge noch am Anfang. Mit dieser Arbeit wurden erstmals folgende sechs Zytokine in der menschlichen Lunge, gewonnen mittels bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF), in Zusammenhang mit *chronischem* Alkoholkonsum untersucht:

1.4.3.1 IL-1 β

IL-1 β erzeugt eine pro-inflammatorische Immunantwort. Es induziert Fieber, stimuliert die Proliferation von T-Helfer-Zellen und fördert B-Zell-Wachstum- und Differenzierung [5]. Laso et al. veröffentlichten 2007 eine Studie an 17 *chronischen* Alkoholikern ohne Leberzirrhose, die u.a. erhöhte Sekretionswerte von IL-1 β durch zirkulierende dendritische Zellen zeigten gegenüber 21 Patienten mit *chronischem* Alkoholkonsum und

Leberzirrhose [75]. Zum Einfluss von Alkohol auf die pulmonale IL-1 β Produktion konnten in der Literatur zwei Studien gefunden werden. Im Rattenmodell war die IL-1 β Konzentration in der BAL durch *akuten* Alkohol beeinträchtigt [53]. Gosset et al. beobachteten 1995, dass die AM von Alkoholikern mit besonders schwerer Leberzirrhose (n=13 von 29 alkoholischen Zirrhotikern insgesamt) nach 3 und 24 h LPS Stimulation signifikant weniger IL-1 β sezernierten als die Kontrollgruppe (n=12) [47].

1.4.3.2 IL-6

IL-6 unterstützt die Reifung von stimulierten B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Außerdem agiert es mit anderen Zytokinen als Stimulus für unreife und reife T-Zellen [5]. Erhöhte Werte von zirkulierendem IL-6 scheinen ein guter Prädiktor für Infektionen nach kardiochirurgischen Eingriffen zu sein [77]. *Akuter* Alkoholeinfluss kann *in vitro* die IL-6 Synthese durch Makrophagen inhibieren [78]. Ferner verminderte *akuter* Alkoholeinfluss im Rattenmodell sowohl die IL-6 mRNA Expression als auch die IL-6 Sekretion in der Lunge [53]. Zudem wird die IL-6 Sekretion der AM bei alkoholbedingten Leberzirrhotikern verringert [47]. Spies et al. konnten 2008 in einem Mausmodell zeigen, dass *subchronischer* Alkoholeinfluss über 8 Tage IL-6 in der Lunge signifikant verringert [12].

1.4.3.3 TNF- α

Als pro-inflammatorisches Zytokin ist TNF- α ein Schlüsselzytokin in der pulmonalen Immunabwehr [2]. TNF- α stimuliert die Neutrophilenmigration, induziert Fieber und stimuliert wiederum Makrophagen, die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α zu produzieren [5]. TNF- α ist für viele Zellen toxisch und zwingt sie in die Apoptose [10]. Eine im Frühjahr 2011 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass TNF- α eine erhöhte Gefäßpermeabilität in der Rattenlunge bewirkt [79]. *Akute* Alkoholintoxikation verminderte die LPS-induzierte Menge an TNF- α in der Lunge von Mäusen sowohl posttranskriptional als auch posttranslational, da die TNF- α mRNA-Expression unbeeinflusst blieb [9, 53, 80, 81]. Eine Veränderung der TNF- α Rezeptorexpression konnte jedoch durch *akuten* Alkoholkonsum im Tierexperiment gezeigt werden, so dass Alkohol neben der Zytokinsekretion auch die andere Seite des Signalweges, die Rezeptorseite, beeinflussen kann [53]. Die Datenlage zum Einfluss von *chronischem* Alkoholkonsum auf die pulmonale TNF- α Produktion ist

dagegen kontrovers. Es gibt Hinweise für eine erhöhte TNF- α Sekretion in der Lunge während andere Arbeiten eine Suppression der TNF- α Sekretion durch die AM nach LPS Stimulation zeigten [9, 47, 53, 81-83].

1.4.3.4 IL-8

IL-8 ist ein potentes Chemokin, welches Neutrophile aktiviert und die Migration zum Infektionsort fördert [5]. Systemisch war die IL-8-Sekretion *in vitro* von Monozyten und Makrophagen aus dem peripheren Blut von Probanden bei *akuten* Alkoholintoxikationen der Zellen vermindert [84]. Interessanterweise scheinen in der Lunge beide Formen, *chronischer* und *akuter* Alkoholkonsum, mit einer gesteigerten Zahl an Neutrophilen im Alveolarraum durch den Stimulus LPS gekennzeichnet zu sein [85]. Ältere Daten konnten dagegen einen hemmenden Effekt von *akuten* Alkoholintoxikationen auf die Neutrophilenrekrutierung- und anzahl in der Lunge feststellen [86]. Generell könnten erhöhte IL-8-Werte im Alveolarraum auch bei der Entstehung des ARDS eine Rolle spielen [87].

1.4.3.5 IL-10

IL-10 wirkt modulierend auf die angeborene Immunantwort und anti-inflammatorisch, indem die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 inhibiert wird [53, 74, 88, 89]. Erhöhte Level von IL-10 sind häufig bei sowohl *akuten* als auch *chronischen* Entzündungen nachweisbar. Eine defizitäre IL-10 Produktion ist assoziiert mit verschiedenen *chronischen* Erkrankungen, wie Morbus Crohn oder *chronischer* Hepatitis [88]. Sander et al. zeigten 2005 für systemisches IL-10 signifikant höhere Werte bei Alkoholikern nach chirurgischen Eingriffen und im Vorfeld von sich anschließenden Infektionen [41]. In der Mauslunge wird interessanterweise IL-10 offenbar konstitutiv produziert [88]. Zu dem gleichen Ergebnis kamen D'Souza El-Guindy et al. aus der BAL bei Mäusen 2007 [53]. Die Rolle der konstitutiven IL-10-Expression in der Lunge ist unbekannt. Die anti-entzündliche Natur von IL-10 könnte aber dazu dienen, die zarte Architektur der Lunge zu schützen. Und zwar durch Hemmung der Auslösung von entzündlichen Prozessen als Reaktion auf eingeatmete Luft, die ein breites Spektrum von harmlosen Partikeln trägt [53, 88]. *Akuter* sowie *subakuter* Einfluss von EtOH scheinen in der Lunge IL-10 im Tiermodell zu erhöhen [12, 38, 53].

1.4.3.6 IL-12(p70)

IL-12 gehört zu den immunmodulierenden Zytokinen mit pro-inflammatorische Potenz [5]. IL-12 aktiviert Natural-Killer-Zellen, T-Zell-Subpopulationen und induziert die zellgetriggerte Immunantwort. Hauptquelle der IL-12-Produktion sind die Monozyten und Makrophagen. Eine der Schlüsselfunktionen von IL-12 in der Lunge ist die Induktion der Expression von IFN- γ , einem wichtigen Zytokin für die Abwehr gegen Erreger wie *Klebsiella pneumoniae* [90]. Laso et al. konnten 2007 im peripheren Blut *chronischer* Alkoholiker ohne Lebererkrankungen eine Erhöhung von IL-12-Level zeigen [72, 75]. Daten zur lokalen IL-12-Konzentration in der Lunge bei *chronischem* Alkoholkonsum konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Experimentelle Untersuchungen bezüglich des *akuten* Alkoholkonsums lassen auf eine unterdrückende Wirkung der systemischen IL-12-Produktion schließen [91].

1.4.4 Effekte von Nikotin auf die Alveolarmakrophagen

Untersuchungen der Effekte von Zigarettenrauch auf die Lunge müssen den Alkoholkonsum berücksichtigen, denn ein Drittel bis die Hälfte aller starken Raucher trinken gesundheitsgefährdende Mengen an EtOH [24]. Im Gegenzug rauchen bis zu 80-95% aller *chronischen* Alkoholtrinker [92, 93]. Zigarettenkonsum erhöht die Anfälligkeit für Infektionen des Atemtraktes [94]. Rauchen mindert die Zilienfrequenz, verursacht dabei den Untergang bzw. die Ablösung der mukoziliären Zilien von den Epithelzellen und verstärkt den negativen Effekt von Alkohol auf die Zilienfunktion und umgekehrt [24]. Rauchen hat Auswirkungen auf den AM Phänotyp, so werden Adhäsionsmoleküle verändert und die HLA-DR Expressionsdichte nimmt ab [64, 95]. Des Weiteren wird die Phagozytoseleistung der AM durch Rauchen signifikant gemindert [96]. In einem Rattenmodell zeigten Gaschler et al. 2008, dass *chronisches* Rauchen nach LPS-Stimulation von AM aus der BAL zu abgeschwächten Zytokinlevel von TNF- α und IL-6 führte, während die TLR-3 und TLR-4-Expression unverändert blieb [97].

2. Fragestellung

Wie genau die Funktion der AM durch Alkohol verändert wird, ist bis heute nicht vollständig verstanden [56]. Der größte Teil an bisherigen Ergebnissen zur Wirkung von Alkohol auf die AM der Lunge fußt auf tierexperimentellen Daten [98]. Zudem wurde meist der Einfluss der *akuten* oder *subakuten* bzw. *subchronischen* Alkoholaufnahme untersucht. Interessanterweise gibt es dabei bis heute keinen allgemeingültigen Konsens der Labormodelle über die maximale Stundenanzahl, welche *akuten* Alkoholkonsum definiert bzw. den Cut-Off zwischen *akutem*, *subchronischem* und *chronischem* Konsum festlegt [2, 98]. Die komplexe Biochemie des Menschen gepaart mit vielen anderen Einflüssen und Co-Faktoren ist hinzukommend bekanntermaßen nicht leicht auf ein Labormodell übertragbar [98]. Mit vorliegender Pilotstudie wurde deshalb in diesem Umfang erstmals versucht, mögliche Veränderungen der humanen AM-Funktion durch *chronischen* Alkoholabusus von Panendoskopiepatienten *ex vivo* zu charakterisieren, mit dem Ziel, folgende Fragen zu beantworten:

1. Inwieweit hat *chronischer* Alkoholkonsum Einfluss auf die Präsenz von HLA-DR, TLR-2 und -4 auf humanen Alveolarmakrophagen?
2. Wie wirkt sich *chronischer* Alkoholkonsum allein und nach LPS-Stimulation auf die Produktionskapazität der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF- α und somit auf die Immunabwehr der humanen Lunge aus?
3. Welchen zusätzlichen Einfluss hat der Co-Faktor Nikotinabusus auf die pulmonale Immunabwehr?

3. Material und Methodik

3.1 Studiendesign

Nach der Befürwortung der klinisch-experimentellen Studie durch die Ethikkommission (Antragsnummer: EA1/192/05) der Charité Universitätsmedizin Berlin wurden 51 Patienten zur elektiven Bronchoalveolären Lavage (BAL) im Zeitraum vom Dezember 2007 bis August 2009 eingeschlossen. Die Patientenrekrutierung erfolgte aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Charité Campus Mitte und Campus Virchow. Alle Patienten waren stationär in der Klinik HNO-CCM bzw. HNO-CVK zur Durchführung einer elektiven Panendoskopie.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

3.2.1 Einschlusskriterien

1. Für die Gruppe der alkoholkranken Patienten:

- Alkoholkonsum $\geq 60\text{g/d}$
und
- AUDIT-Score $m \geq 8$, $w \geq 5$

2. Für die Kontrollgruppe:

- Alkoholkonsum $< 60\text{g/d}$
und
- AUDIT-Score $m < 8$, $w < 5$

3.2.2 Ausschlusskriterien

- Fehlende Einverständniserklärung
- Alter < 18 Jahre
- Lungenerkrankungen mit Oxygenierungsstörung (COPD IV o.ä.)
- Leberinsuffizienz ($> \text{Child B}$)
- Herzerkrankungen (MI < 8 Wochen)
- HIV-Infektion

- Therapie mit Glukokortikoiden oder anderen Immunsuppressiva
- Z. n. Transplantation
- Prä-operativ bestehende Infektionen
- Schwangerschaft

3.3 Gruppeneinteilung

Die Patienten wurden nach den geltenden DSM-IV Kriterien zum Alkoholmissbrauch stratifiziert und bezüglich der Alkoholabhängigkeit in die Patientengruppen mit Alkoholmissbrauch (AUD) und ohne Alkoholmissbrauch (nAUD) eingeteilt. Zur Verifikation von *chronischem* und gesundheitsgefährdendem Alkoholabusus wurden die Biomarker γ -GT, GOT, GPT, MCV und CDT, anamnestische Angaben zum Alkoholkonsum sowie die alkoholrelevanten klinischen Fragebögen AUDIT und CAGE genutzt.

3.3.1 AUDIT-Fragenkatalog

Der AUDIT ist ein von der WHO entwickelter Fragenkatalog, um Personen zu identifizieren, deren Alkoholkonsum riskant oder schädlich für ihre Gesundheit ist [99]. Dieser inkludiert zehn Fragen, wovon drei auf die Menge und die Frequenz von Alkoholkonsum abzielen, drei auf die Abhängigkeit und weitere vier auf die Probleme, die durch vermehrten Alkoholkonsum entstehen können. In mehreren Studien konnten gute Sensitivitätswerte und dem gegenüber leicht verminderte aber akzeptable Spezifitätsraten bei der Detektion von durch häufigen Alkoholkonsum gefährdeten Patienten mit dem AUDIT gezeigt werden [100-106]. Der AUDIT-Fragebogen gilt deshalb als sehr aussagekräftiger Selbsttest und in die tägliche präoperative Klinikroutine gut integrierbar, wenngleich er relativ zeitaufwendig ist [100-106]. Der Testbogen wird an der Charité Campus Mitte und Virchow standardmäßig von jedem OP-Patienten während der präoperativen Visite ausgefüllt. Der AUDIT gilt als positiv, wenn Frauen mindestens 5 Punkte erreichen. Bei Männern ist der Cut-off bei >7 Punkten. Laut einer Querschnittstudie von Kraus et al. erreichten 2009 knapp 20 Prozent aller deutschen Frauen und Männer zwischen 18 und 59 Jahren einen Score von ≥ 8 [107].

Tabelle 1: Der AUDIT-Fragenkatalog

Frage	Intention
1) Wie oft nehmen Sie ein alkoholisches Getränk zu sich? 2) Wenn Sie alkoholische Getränke zu sich nehmen, wie viel trinken Sie dann typischerweise an einem Tag? (Ein alkoholhaltiges Getränk ist z. B. ein kleines Glas oder eine Flasche Bier, ein kleines Glas Wein oder Sekt, ein einfacher Schnaps oder ein Glas Likör) 3) Wie oft trinken Sie 6 oder mehr Gläser Alkohol bei einer Gelegenheit?	Menge, Frequenz
4) Wie oft haben Sie in den letzten 12 Monaten erlebt, dass Sie nicht mehr mit dem Trinken aufhören konnten, nachdem Sie einmal begonnen hatten? 5) Wie oft passierte es in den letzten 12 Monaten, dass Sie wegen des Trinkens Erwartungen, die man an Sie in der Familie, im Freundeskreis und im Berufsleben hat, nicht mehr erfüllen konnten? 6) Wie oft brauchten Sie während der letzten 12 Monate am Morgen ein alkoholisches Getränk, um sich nach einem Abend mit viel Alkoholgenuss wieder fit zu fühlen?	Abhängigkeit
7) Wie oft hatten Sie während der letzten 12 Monate wegen Ihrer Trinkgewohnheiten, Schuldgefühle oder Gewissensbisse? 8) Wie oft haben Sie sich während der letzten 12 Monate nicht mehr an den vorangegangenen Abend erinnern können, weil Sie getrunken hatten? 9) Haben Sie sich oder eine andere Person unter Alkoholeinfluss schon einmal verletzt? 10) Hat ein Verwandter, Freund oder auch ein Arzt schon einmal Bedenken wegen Ihres Trinkverhaltens geäußert oder vorgeschlagen, dass Sie Ihren Alkoholkonsum einschränken?	Soziale Folgen, Probleme

3.3.2 CAGE-Fragenkatalog

Zur Detektion der Alkoholkrankheit wird ebenfalls der CAGE-Fragenkatalog in der klinischen Routine verwendet. Aertgeerts et al. fanden in einer Metaanalyse von 2004 eine gute Korrelation zwischen CAGE und den damals gültigen DSM Kriterien für Alkoholabhängigkeit, wenngleich der CAGE-Test dem AUDIT hinsichtlich des positiven prädikten Werts unterlegen ist [108, 109]. Außerdem lässt sich mit dem CAGE keine Unterscheidung von früherem und aktuellem Alkoholmissbrauch der Patienten

feststellen. Im Akronym **CAGE** steht das **C** für „Cut Down Drinking“, das **A** für „Annoyance“, **G** für „Guilty“ und **E** für „Eye Opener“. Daraus leiten sich die vier Fragen des Selbsttests ab:

- 1) Haben Sie jemals versucht, Ihren Alkoholkonsum zu reduzieren (**C**ut Down Drinking)?
- 2) Haben Sie sich jemals über die Kritik der Umgebung an Ihrem Trinkverhalten geärgert (**A**nnoyance)?
- 3) Hatten Sie jemals Schuldgefühle wegen Ihres Alkoholkonsums (**G**uilty)?
- 4) Haben Sie jemals am Morgen Alkohol getrunken, um richtig leistungsfähig zu werden oder Entzugssymptome zu vermeiden (**E**ye Opener)?

Bei drei oder mehr positiv beantworteten Fragen durch den Patienten gilt ein gesundheitsgefährdender Alkoholkonsum als wahrscheinlich, der Test wird positiv gewertet.

3.3.3 Laborparameter und Anamnese

Zusätzlich wurde aus dem Vollblut der Probanden die Laborparameter GOT, GPT, γ -GT, MCV, Harnsäure und CDT bestimmt. Die Qualität der Ergebnisse bzw. die Präzision der Fragebögen AUDIT und CAGE können durch Hinzunahme der alkoholrelevanten Biomarker wesentlich verbessert werden [33, 110-112]. Bei jedem Studienteilnehmer wurde sorgfältig die Anamnese erhoben, klinische Patientendaten erfasst und zusätzliche studienrelevante Daten, wie z.B. Volumina und Grammzahl der alkoholischen Getränke pro Tag oder Woche nach einem Protokoll abgefragt.

3.4 Studienprotokoll

3.4.1 Überblick

Vor der geplanten Panendoskopie wurde bei jedem Patienten eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) im rechten Mittellappen mit NaCl durchgeführt und venöses Blut entnommen. Die Patienten waren während der Untersuchung mit FiO₂ 1,0 beatmet. Anschließend wurde die Konzentration von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im

Überstand der BAL-Flüssigkeit (BALF) bestimmt. Des Weiteren ermittelten wir die Expression von HLA-DR auf den Alveolarmakrophagen, sowie TLR-2 und -4. Alle Messungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein 1968 u.a. in Münster (Deutschland) entwickeltes optisches Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel analysiert [113]. Mehrere Parameter können so als optische Signale von je einer einzelnen Zelle erfasst werden, sofern die Zellen als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Gewebsverbände müssten z.B. enzymatisch aufgetrennt werden [113]. Die Zellen werden im „Gänsemarsch“ zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie von einem Laserstrahl einzeln beleuchtet werden. Das Laserlicht wird bei Durchtritt durch die jeweilige Zelle in einen sogenannten Vorwärts- und Seitwärtsstrahl gestreut. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung hängt global von der Querschnittsfläche, der Granularität, aber auch dem Refraktionsindex und der Struktur der Zellmembran ab. Hierdurch lassen sich z.B. Leukozytenuntergruppen unterscheiden. Mit Farbstoffen markierte Antikörper emittieren Licht in der jeweiligen Wellenlänge des gewählten Fluorochromes nach Anregung durch den Laser. Mittels der in unterschiedlichen Farben aufleuchtenden Antikörper (Sonden) sind nun zusätzlich weitere Zelleigenschaften oder Partikel durch eine einzelne Messung beschreibbar [113]. Abschließend werden die genannten optischen Signale in elektrische Impulse konvertiert und grafisch als sogenannte Dot Plots dargestellt (Abbildung 3). Ein einzelner Punkt (Dot) entspricht dabei einer Zelle bzw. einem gemessenen Partikel.

Sämtliche Messungen dieser Arbeit wurde mit dem FACScanto™ II (FACScanto™ II, BD, Rutherford, NJ, USA) durchgeführt. Die graphische Auswertung erfolgte durch die computerbasierte Software CellQuest™ (BD, San Jose, CA, USA).

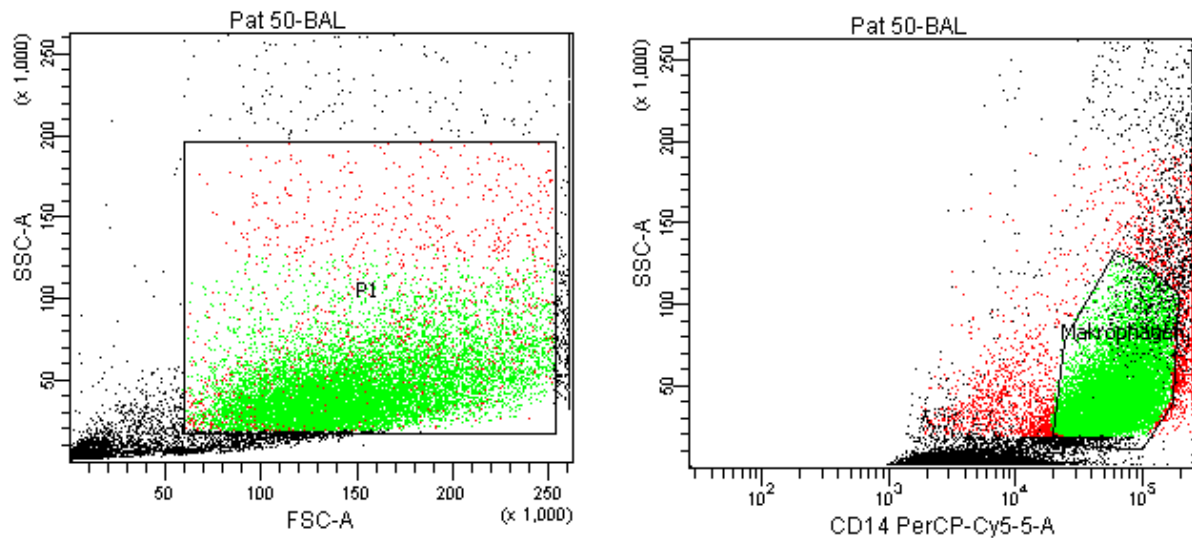


Abbildung 3: Dot Plots der mit Anti-HLA-DR markierten Alveolarmakrophagen (grün) aus der BAL bei Patient 50. Ein Punkt entspricht einem Anti-HLA-DR Antikörper (SSC=Seitwärtsstreulicht, FSC=Vorwärtsstreulicht).

3.4.3 Isolierung der Alveolarmakrophagen

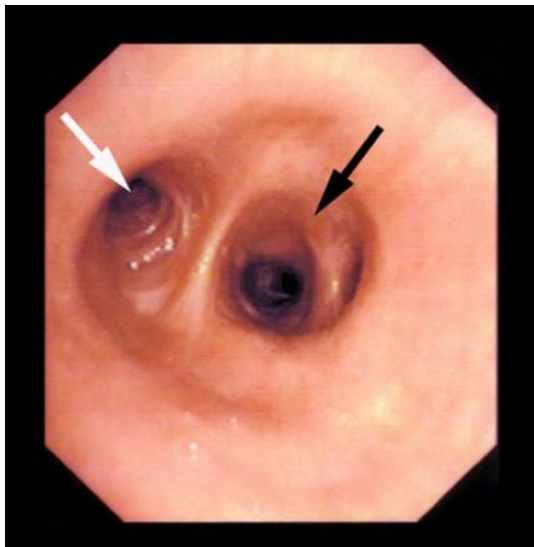


Abbildung 4: Blick über das Bronchoskop auf den Eingang des rechten Mittellappens (weißer Pfeil) und Lungenunterlappens (schwarzer Pfeil)

Um die Immunzellen der einzelnen Patienten aus der BAL messen zu können, klärte ein Anästhesist unserer Klinik einen Tag vor der geplanten Panendoskopie die Patienten über die Studieninhalte- und Risiken auf. Nach Einwilligung und negativem Matching der Ausschlusskriterien folgte tags darauf der Eingriff. Mit Beginn der anästhesiologischen Vorbereitungen am Patienten im Einleitungssaal wurde venöses Blut für 2 Serumröhrchen (Becton Dickinson [BD], Rutherford, NJ; USA), 2 durch EDTA antikoagulierte Röhrchen (Becton Dickinson [BD], Rutherford, NJ, USA) und 1 Citratröhrchen (Becton Dickinson [BD],

Rutherford, NJ, USA) entnommen. Die Probanden wurden dosisangepasst mit Dormicum bzw. Atosil prämediziert, mit FiO₂ 1,0 präoxygeniert unter Monitoring nach Klinikstandard. Anschließend wurden die Patienten nach Narkoseeinleitung mit Remifentanyl und Propofol sowie unter der Gabe eines kurzwirksamen Muskelrelaxanz

wie Mivacurium intubiert. Daraufhin erfolgte die Bronchoskopie mittels Studienbronchoskop (PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Germany) und die standardisierte BAL des rechten mittleren Lungenlappens (Abbildung 4) durch den Studienarzt. Bei erfolgreicher bronchoskopischer Einstellung des Mittellappens, erfolgte die manuelle Spülung desselbigen mit 6 Spritzen (B. Braun, Melsungen, Germany) á 20ml NaCl (Isotone Kochsalzlösung 0,9% B. Braun, Melsungen, Germany). Zwischen den einzelnen Volumengaben wurde jeweils das bereits zuvor applizierte NaCl plus Bronchialsekret aspiriert und unter Zuhilfenahme eines Schleimprobenbehälters (Covidien, Mansfield, MA, USA) aufgefangen. Die Lavage und das Blut stellten wir anschließend auf Eis in einer Styroporbox zum Transport in das Labor.

Die Blutproben wurden direkt nach der Lavage durch das Zentrallabor der Charité CVK hinsichtlich Differentialblutbild und Biomarkern untersucht und ausgewertet.

3.4.4 Aufbereitung der BALF und Bestimmung der Zellzahl

Die aus den Bronchien gewonnene Lavage (BALF) filtrierten wir unter der Sterilbank (Herasafe HS12/2, Heraeus, Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, USA) im anästhesiologischen Labor des CVK durch ein 100µm Zellsieb (Cell Strainer, 10µm Nylon, BD Biosciences Europe, Belgium) in ein 50ml Tube (Blue Max™ 50ml Polypropylene Conical Tube, BD Labware Europe, Le Pont De Claix, France) und zentrifugierten den Inhalt anschließend bei 60G 10 Minuten lang ohne Bremsung (Multifuge 3 I-r, Thermo Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Germany). Anschließend dekantierten wir den Überstand und nahmen das Pellet in einem Volumen von 1000µl RPMI-Komplettmedium (Mischung aus 500ml RPMI 1640 [PAA, Cölbe; Germany], 10ml hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum [Biochrom AG, Berlin, Germany], 5ml Penicillin/Streptomycin [Biochrome AG, Berlin, Germany] und 5ml L-Alanyl-L-Glutamin [Biochrome AG, Berlin, Germany]) auf und resuspendierten das Gemisch mehrfach.

Danach bestimmten wir die Zellzahl der Alveolarmakrophagen. Dazu versetzten wir 190µl 3%ige Essigsäure mit 10µl Zellsuspension, also in einer Verdünnung von 1:20. Bei erwartet sehr wenigen Zellen reduzierten wir das Verhältnis auf bis zu 1:2, also zum Beispiel mit einer Mischung von 100µl Essigsäure und 50µl Zellsuspension. Die jeweilige

Verdünnung wurde anschließend einige Sekunden mittels Vortexer (Typ VF2, Janke& Kunkel ika[®] Labortechnik, Staufen, Germany) gut durchmischt.

Von der Lösung wurden 10µl entnommen und in die vorbereitete Neubauer Zählkammer (Neubauer Bright Line 0,100mm Tiefe, LO Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Germany) pipettiert (Pipettenspitze 10µl farblos, Sarstedt, Germany) und die Makrophagen pro Quadrant ausgezählt und summiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus den gezählten Makrophagen aller Quadranten mit dem Verdünnungsfaktor und mit 10^4 multipliziert. Somit erhielten wir das Produkt der Zellzahl in 10^6 pro Milliliter (10^6 /ml).

3.4.5 HLA-DR aus BALF

Um das Antigen HLA-DR auf der Oberfläche von Alveolarmakrophagen detektieren zu können, wurde die BALF jedes Probanden mit fluoreszierenden Antikörpern inkubiert, was im Folgenden erläutert wird.

Das Prinzip der Messung der HLA-DR-Expression auf Makrophagen beruht auf der Generierung einer Eichkurve mittels QuantiBRITE™ PE-Beads und der Färbung von HLA-DR mittels anti-HLA-DR-Antikörper, die in einem Verhältnis von 1:1 ihrerseits mit den gelbrot fluoreszierenden PE Molekülen konjugiert sind. Zur Bestimmung der HLA-DR-Antigene pro Makrophage wurden ebenfalls PE markierte und makrophagenspezifische Antikörper benutzt (QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5, BDIS, San Jose, CA, USA). Das Anti-HLA-DR reagiert spezifisch mit einem nicht polymorphen HLA-DR-Epitop ohne Kreuzreaktion mit HLA-DQ oder HLA-DP. Die Quantibrite™ PE Eichbeads sind mit definierten Mengen an PE-Molekülen markiert und wurden mit den gleichen Geräteeinstellungen gemessen wie die HLA-DR-Expression der (Alveolar-)Makrophagen. Die Fluoreszenzintensitäten der Beads wurden gegen die definierten Mengen an PE-Molekülen pro Bead aufgetragen und erlaubten so die Übertragung von Fluoreszenzintensitäten der HLA-DR-Messung in PE bzw. Antikörper pro Makrophage [114]. Mittels bekannter Antikörper-pro-Antigen Stöchiometrie ließ sich dann die finale Zahl an Antigenen pro Zelle errechnen.

Zur Probenaufbereitung gaben wir 50µl BALF mit 2,5µl Quantibrite Anti-HLA-DR PE in ein Falconröhrchen (5ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Falcon™, Erembodegem, Belgium). Nach gründlichem Mischen (Typ VF2, Janke& Kunkel ika[®] labortechnik,

Staufen, Deutschland) inkubierten wir die Probe bei Raumtemperatur in Dunkelheit. In dieser Zeit können die AK an die Zielantigene HLA-DR der Makrophagen binden. Nach 30 Minuten wuschen wir die Mischung mit 1ml FACS Puffer (20ml hitzeinaktiviertes 2% FCS, 0,1% NaN₃ auf 1000ml mit PBS aufgefüllt) und zentrifugierten das Ganze für 5 Minuten bei 200G (Multifuge 3 I-r, Thermo Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland). Abschließend saugten wir den Überstand bis auf 100µl ab und stellten die messfertige Probe auf Eis.

Tabelle 2: Pipettierschema für HLA-DR-Messung

Ansatz	BAL Diff	BAL HLADR
AK-Mix BAL Diff	25µl	-
QuantiBRITE HLADR	-	2,5µl
BALF (10x10 ⁶ Zellen)	50µl	50µl
	Vortex	
FACS Puffer	1ml	1ml
Zentrifugation	5min bei 200g	
Absaugen auf ca. 100µl	je	je
Lagerung	4°C auf Eis	

3.4.6 Bestimmung von TLR-2 und TLR-4

Für die Aufbereitung von TLR-2 und -4 wurde nach ähnlichem Schema wie bei HLA-DR verfahren. Das Prinzip der Antikörperbindung an die Rezeptoren funktioniert wie bereits oben eingehend erläutert. Statt den Quantibrite™ Anti-HLA-DR-AK wurden folgende TLR- 2 bzw. -4 und makrophagenspezifische Antikörpermischungen verwendet, um die jeweiligen TLR-Rezeptoren auf den Alveolarmakrophagen markieren und dann detektieren zu können.

Tabelle 3: AK-Mischungen für TLR-Messung

AK-Mix BAL	TLR-2	AK-Mix BAL	TLR-4
CD45 PerCP	10µl	CD45 PerCP	10µl
CD14 APC	5µl	CD14 APC	5µl
TLR2 FITC	5µl	TLR4 PE	5µl
IgG2a PE	5µl	IgG2a FITC	5µl

Zu je 50µl der aufbereiteten BALF wurden nun 25µl vom jeweiligen AK-Mix TLR-2 bzw. -4 gegeben und anschließend gut gemischt. Danach inkubierten wir die Proben bei 4°C für 30 Minuten, um daraufhin die Mischung mit 1ml FACS-Puffer zu waschen. Nach 5 Minuten der Zentrifugation bei 200G (Multifuge 3 I-r, Thermo Scientific Germany Ltd. &Co. KG, Bonn, Deutschland) saugten wir auch diese FACS-Ansätze bis auf 100µl ab und lagerten sie auf Eis bis zur FACS-Messung.

3.4.7 LPS-Stimulation der AM

Für die Stimulation mittels LPS entnahmen wir Proben aus der BALF. Durch das Fragment LPS von gram-negativen Bakterien wird die inflammatorische Antwort von Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen induziert und diese angeregt, pro- und anti-inflammatorische Zytokine zu exprimieren [2, 78].

Aus der, wie unter 3.4.4 beschrieben, aufbereiteten BALF wurde jeweils 100µl mit einer bioinaktiven Pipettenspitze (Biopur epT.I.P.S. Singles 2-200µl, Eppendorf, Hamburg, Germany) entnommen, um iatrogene bakterielle Verunreinigungen zu vermeiden. Folgendes Schema (Tabelle 4) wurde bei jedem Patienten für die Stimulationsansätze mit der Stammlösung LPS verwendet:

In das erste Reaktionsgefäß (1,5ml Biopur SL, Eppendorf, Hamburg, Germany) gaben wir 100µl BALF und 400µl RPMI Komplettmedium anstelle von LPS als Leerwertreferenz - in das zweite Reaktionsgefäß 100µl BALF auf 400µl Stammlösung LPS (100ng/ml) für einen 4h Ansatz. In das dritte Reaktionsgefäß wurde wiederum 100µl BALF und 400µl Stammlösung LPS (100ng/ml) für einen 24h Ansatz gegeben.

Anschließend wurden alle 3 Stimulationsansätze im Brutschrank (CO₂ Incubator, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert.

Nach 4 Stunden entnahmen wir das Leerwerttube und die beiden Ansätze der BALF. Die entnommenen Proben wurden daraufhin im Microcyclor (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) 5 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute (upm) und 20°C herunter zentrifugiert. Anschließend aliquotierten wir den klaren Überstand, der die produzierten Zytokine enthält, von 100µl und 300µl in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß Biopur SL (Eppendorf, Hamburg, Germany). Diese 6 Proben wurden abschließend bei -80°C bis zur Messung kryokonserviert. Die 24h Ansätze der BAL wurden nach Abschluss der Inkubationsphase nach gleichem Schema sowohl zentrifugiert und der aliquotierte Überstand von 100µl und 300µl jeweils in 1,5ml Tubes (Safe-Lock Tubes 1,5ml Biopur, Eppendorf, Hamburg, Germany) bei -80°C bis zur Durchflusszytometrie gelagert.

Tabelle 4: Pipettierschema LPS-Stimulationen

Ansatz	LPS Leerwert 4h	LPS Stim BAL 4h	LPS Stim BAL 24h
RPMI Kompletmedium	400µl	-	-
Stammlösung LPS (BAL) 100ng/ml	-	400µl	400µl
BALF (5x10 ⁶ Zellen)	100µl	100µl	100µl
Inkubationszeit	4h bei 37°C	4h bei 37°C	24h bei 37°C
Zentrifugation	5min bei 3000upm		
Überstand aliquotieren in	Je Ansatz 2 x 1,5ml Reaktionsgefäß		
Menge / Tube	100µl, 300µl	100 µl, 300µl	100µl, 300µl
Lagerung	-80°C		

3.4.8 Messungen der Zytokine

Die kryokonservierten und mit LPS stimulierten Testreihen wurden am Ende der Patientenrekrutierung auf Zimmertemperatur gebracht und mittels Human Inflammation Kit (Human Inflammation Kit, BD, San Jose, CA, USA) die Zytokinkonzentrationen am

Durchflusszytometer gemessen. Das Prinzip ist, dass 6 Beads mit klar divergierenden Fluoreszenzen mit jeweils dem spezifischen Antikörper für IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α und IL-12p70 gekoppelt sind. Mit einer FACS Messung können dann pro Ansatz die Konzentration genannter Zytokine in pg/ml ermittelt werden. Die Vergleichbarkeit der Messungen wird durch einen internen Standard bei den FACS Einstellungen gewährleistet. Da pro ml BALF die Zahl von asservierten AM aus den verschiedenen Patientenproben divergiert und mit ihr natürlich auch die Fähigkeit, bestimmte Konzentrationen an Zytokinen zu erzeugen, rechneten wir gemessene Zytokine von pg/ml auf pg / 10⁶ AM nach folgender Formel um:

$$Zytokin a \left(\frac{pg}{ml} \right); 1ml = b AM (in 1ml BALF); \frac{Zytokin a \left(\frac{pg}{ml} \right)}{Zytokin a \left(\frac{pg}{10^6 AM} \right)} = \frac{b AM}{10^6 AM}$$

$$\frac{Zytokin a \times 10^6 AM}{b AM} = Zytokin a \left(\frac{pg}{10^6 AM} \right)$$

Dadurch sind die einzelnen Ergebnisse zueinander stöchiometrisch korrekt in Beziehung zu setzen.

3.5 Statistik

Die deskriptive, statistische und graphische Auswertung erfolgte mit SPSS 18.0 (Windows-Version). Für den Vergleich von metrischen und ordinal skalierten Variablen in unabhängigen Gruppen kam der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Signifikante Ergebnisse sind in den Tabellen und Grafiken mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Da hinsichtlich der Fragestellung keine Studien gefunden werden konnten, die eine Fallzahlberechnung ermöglicht hätten, wurde die Studie als Pilotstudie geplant und durchgeführt. Aus diesem Grund wurde eine rein deskriptive Statistik verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Basischarakteristika

Von primär 51 untersuchten Patienten konnten 5 BALF Proben der entsprechenden Patienten nicht verwertet werden, da die Lavage durch zähes Bronchialsekret und / oder Blut verunreinigt war und letztlich zu wenig geeignete ($<10^6$ AM / Patient) Alveolarmakrophagen für die FACS-Messungen asserviert wurden. Bei einem weiteren Patienten konnten die LPS-Stimulationen der Alveolarmakrophagen nicht mittels Durchflusszytometrie ausgewertet werden, da die kryokonservierten Tubes vor der FACS- Messung entwendet wurden.

Nach den unter Punkt 3 erläuterten Kriterien wurden von den 46 sekundär eingeschlossenen Patienten 15 als Nichtalkoholiker (nAUD) gewertet und dementsprechend 31 Patienten der Gruppe der chronischen Alkoholmissbraucher (AUD) zugeteilt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Geschlechterverteilung beider Gruppen. In der AUD-Gruppe dominierte das männliche Geschlecht. Auch die absolute Anzahl an Rauchern und Packungsjahren war in der AUD-Gruppe signifikant erhöht (Tabelle 5). In beiden Gruppen waren die Nebenerkrankungen bis auf die COPD homogen verteilt (Tabelle 7). Die Alkoholgruppe hatte signifikant einen höheren Teil an COPD-Patienten, was gut mit den Signifikanzen bezüglich der Raucherprävalenzrate und den Packungsjahren in der AUD-Gruppe korreliert. Des Weiteren sind in der AUD-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen von Monozyten im Differentialblutbild gemessen worden. Die Alkoholgruppe zeigte signifikant erhöhte Werte für den ermittelten AUDIT-Score sowie für die Biomarker CDT, MCV sowie γ -GT. Interessanterweise konnten keine signifikanten Unterschiede der erreichten Punktzahl für den CAGE-Score zwischen beiden Gruppen ermittelt werden.

Tabelle 5: Allgemeine Basischarakteristika

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
Alter	63 (50 / 72)	65 (58 / 70)	0,648
Raucher aktiv	15 (48,4%)	11 (73,3%)	0,114
Raucher aufgehört	9 (29,0%)	3 (20,0%)	

Nichtraucher	7 (22,6%)	1 (6,7%)	
PY (gesamt)	15,75 (02,50 / 40,00)	30,00 (25,00 / 77,50)	0,039*
BMI	24,07 (21,46 / 26,54)	24,49 (21,30 / 28,40)	0,446
Geschlecht (w/m)	11 / 20	1 / 14	0,039*
Anästhesiedauer ¹	80,00 (65,00 / 100,00)	65,00 (55,00 / 105,00)	0,259
OP-Dauer ¹	45,00 (35,00 / 65,00)	35,00 (25,00 / 40,00)	0,099
Spülmenge BAL ²	120,00 (120,00 / 140,00)	120,00 (100,00 / 140,00)	0,569
BALF (Recovery) ²	52,00 (42,50 / 62,00)	49,00 (32,50 / 60,00)	0,192

n=Patientenanzahl; Alter in Jahren; w=weiblich, m=männlich; PY=pack years, BMI=body mass index, ¹Anästhesiedauer und OP-Dauer in Median Minuten, ²Spülmenge BAL und BALF (Recovery) in Median ml, Medianwerte (25.Perzentile/75.Perzentile oder Prozentsatz der Gruppe), Mann-Whitney-U-Test; p=Signifikanz zwischen den Gruppen

Tabelle 6: Alkoholspezifische Fragebögen, Werte und Biomarker

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
AUDIT Punkte	02,00 (00,75 / 03,25)	10,00 (06,00 / 13,00)	<0,001*
AUDIT +/-	2 / 28	10 / 5	
CAGE Punkte	00,00 (00,00 / 01,50)	01,00 (00,00 / 02,00)	0,509
CAGE +/-	7 / 22	4 / 10	
Tagesdosis C2 in g	00,00 (00,00 / 02,05)	80,00 (68,40 / 108,00)	<0,001*
CDT in %	01,60 (1,50 / 1,80)	02,70 (01,75 / 03,65)	0,001*
γ-GT in U/l	23,00 (14,00 / 28,50)	29,50 (23,00 / 67,50)	0,031*
MCV in fl	90,00 (87,00 / 92,50)	93,50 (89,00 / 98,00)	0,043*
GOT in U/l	26,00 (19,00 / 33,00)	30,50 (23,75 / 37,25)	0,108
GPT in U/l	16,00 (11,50 / 22,50)	20,00 (14,00 / 31,50)	0,275
Harnsäure in mg/dl	05,00 (03,90 / 05,80)	06,70 (05,60 / 08,00)	0,003*
Hämatokrit in l/l	00,38 (00,34 / 00,42)	00,37 (00,33 / 00,42)	0,568

n=Patientenanzahl; Medianwerte (25.Perzentile/75.Perzentile); AUDIT und CAGE als Median der absoluten Punktzahlen, Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

Tabelle 7: Komorbiditäten

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
Art. Hypertonie	11 (35,5%)	7 (46,7%)	0,471
Niereninsuffizienz	0	1 (6,7%)	0,151
Diabetes	5 (16,1%)	0	0,103
Fettstoffwechselstörungen	6 (19,4%)	4 (26,7%)	0,577
Adipositas	4 (12,9%)	1 (6,7%)	0,529
Asthma	1 (3,2%)	2 (13,3%)	0,198
COPD	4 (12,9%)	6 (40,0%)	0,039*

n=Patientenanzahl; COPD=Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung; Medianwerte (Anteil an n in %), Mann-Whitney-U-Test; p=Signifikanz zwischen den Gruppen

Tabelle 8: Differentialblutbild

Parameter	nAUD (n=29) ¹	AUD (n=14) ¹	p
Leukozyten ²	5,24 (4,38 / 6,10)	5,82 (3,85 / 8,94)	0,366
Erythrozyten ³	4,24 (4,00 / 4,65)	3,62 (3,26 / 4,41)	0,095
Thrombozyten ²	202,7 (146,0 / 240,0)	208,0 (167,0 / 317,0)	0,400
Neutrophile ²	3,19 (2,64 / 3,66)	3,56 (2,64 / 6,35)	0,159
Lymphozyten ²	1,28 (0,87 / 2,04)	1,27 (0,71 / 1,79)	0,762
Monozyten ²	0,47 (0,35 / 0,59)	0,61 (0,50 / 1,05)	0,015*
Eosinophile ²	0,12 (0,07 / 0,19)	0,11 (0,05 / 0,25)	0,927
Basophile ²	0,02 (0,01 / 0,03)	0,02 (0,02 / 0,04)	0,438

¹Bei insgesamt 3 Patienten waren Differentialblutbilder nicht verfügbar; ²Einheit: /nl; ³Einheit: /pl; n=Patientenanzahl; Medianwerte (25.Perzentile/75.Perzentile), Mann-Whitney-U-Test; p=Signifikanz zwischen den Gruppen

4.2 Einfluss von AUD auf die Funktion von AM

4.2.1 HLA-DR, TLR-2 und -4 auf Makrophagen in BALF

Zwischen den AUD- und nAUD-Gruppen gab es bezüglich HLA-DR, TLR-2 und -4 auf den Alveolarmakrophagen keine signifikanten Unterschiede.

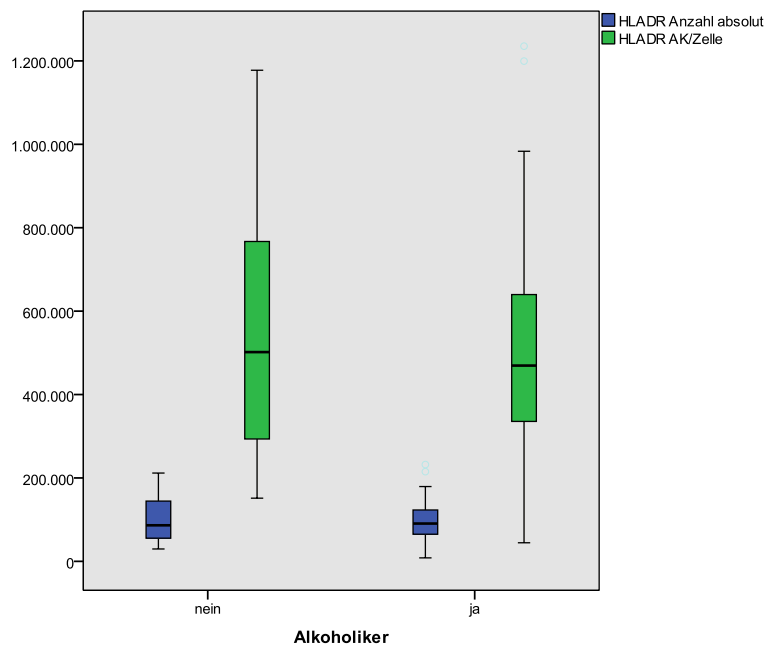


Abbildung 5: HLA-DR Messungen auf den AM absolut und in Relation

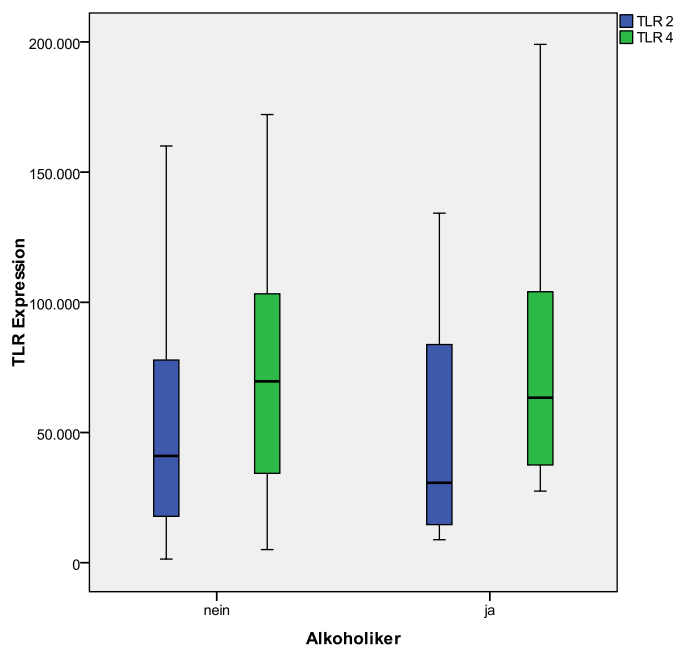


Abbildung 6: TLR-Expression auf den AM gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units)

4.2.2 Zytokinbestimmungen

4.2.2.1 Zytokine in BALF ohne Stimulation und Inkubation

Sämtliche Zytokinkonzentrationen der AUD-Gruppe waren ohne LPS Stimulation und Inkubation gegenüber der nAUD erhöht, wengleich nur 3 Zytokine Signifikanzniveau erreichten (Abbildung 2): Die Th1 Zytokine IL-1 β und IL-12p70 sowie das Th2 Zytokin IL-10 waren *ex vivo* unstimuliert in der AUD-Gruppe signifikant erhöht (Einheiten in pg/10⁶ AM).

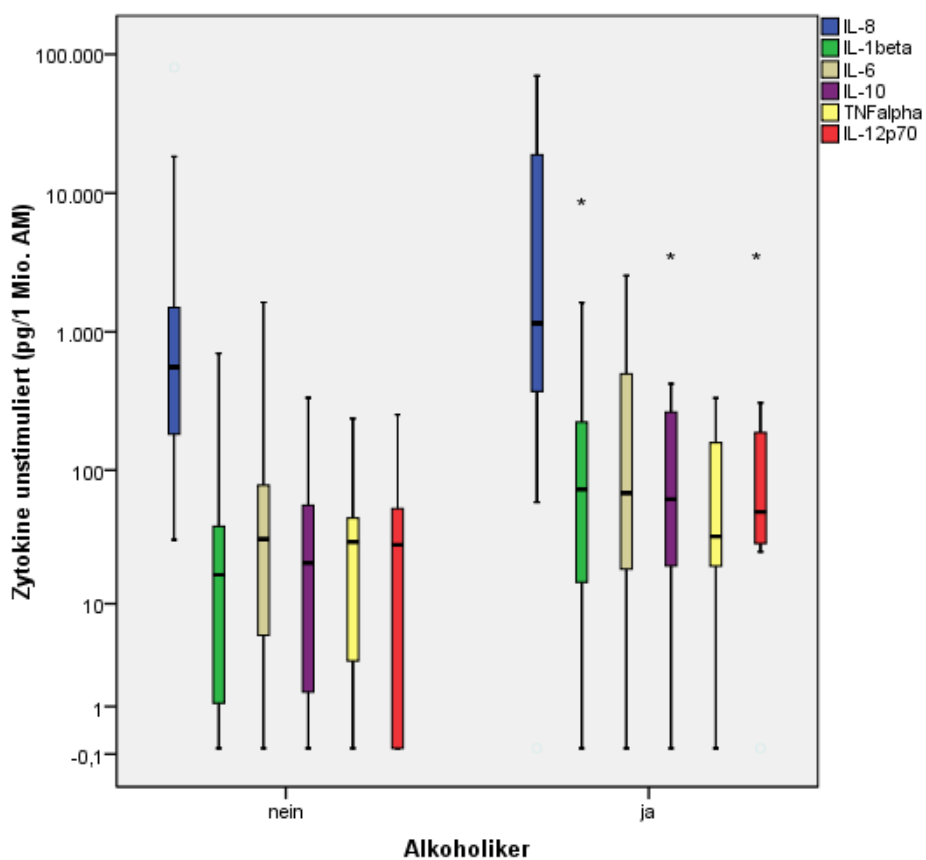


Abbildung 7: Zytokinkonzentrationen (pg/10⁶ AM) ohne LPS-Stimulation und Inkubation

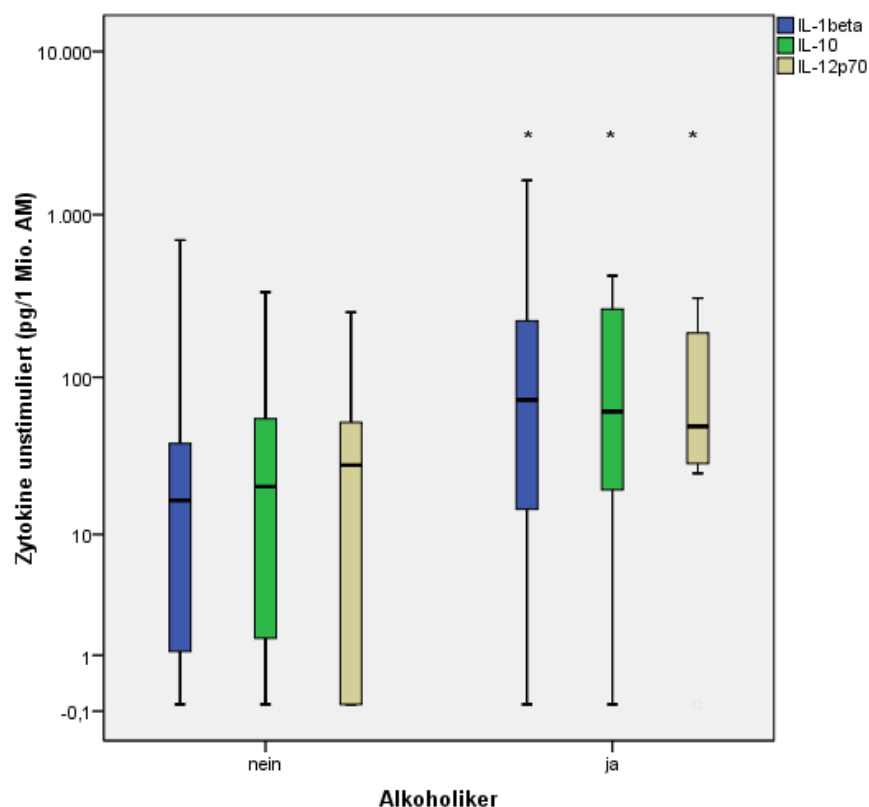


Abbildung 8: Signifikante Zytokinkonzentrationen (pg/10⁶ AM) ohne Stimulation

Tabelle 9: Signifikanzen der unstimulierten Zytokine

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
IL1-β	16,79 (0,00 / 39,15)	72,35 (14,7 / 223,03)	0,025*
IL-10	20,62 (0,00 / 57,05)	61,44 (19,65 / 262,84)	0,041*
IL-12p70	28,24 (0,00 / 53,59)	49,47 (28,88 / 187,43)	0,016*

n=Patientenanzahl; Zytokinkonzentrationen in pg/10⁶AM angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

4.2.2.2 Zytokine in BALF nach 4h LPS-Stimulation

Nach vier Stunden *ex vivo* LPS-Stimulation (Abbildung 9) war das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 noch signifikant in der AUD-Gruppe erhöht (Abbildung 9 und 10), während die Konzentration von dem pro-inflammatorischen Monokin TNF-α (Abbildung 9 und 10) in selbiger erniedrigt war (Einheiten in pg/10⁶ AM).

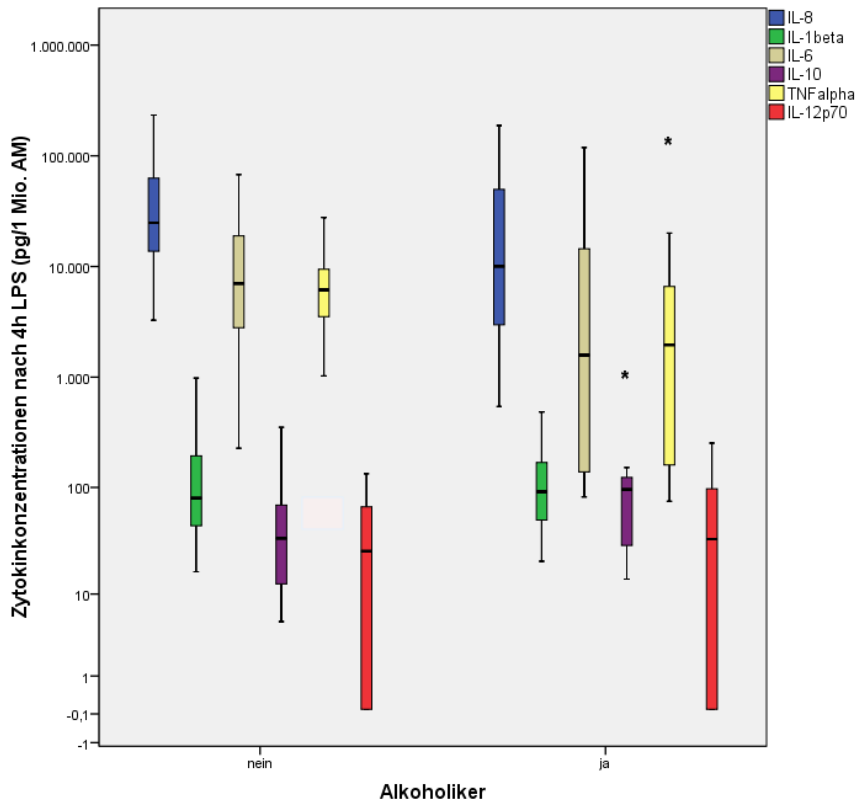


Abbildung 9: Zytokinkonzentrationen (pg/10⁶ AM) nach 4-stündiger LPS Stimulation

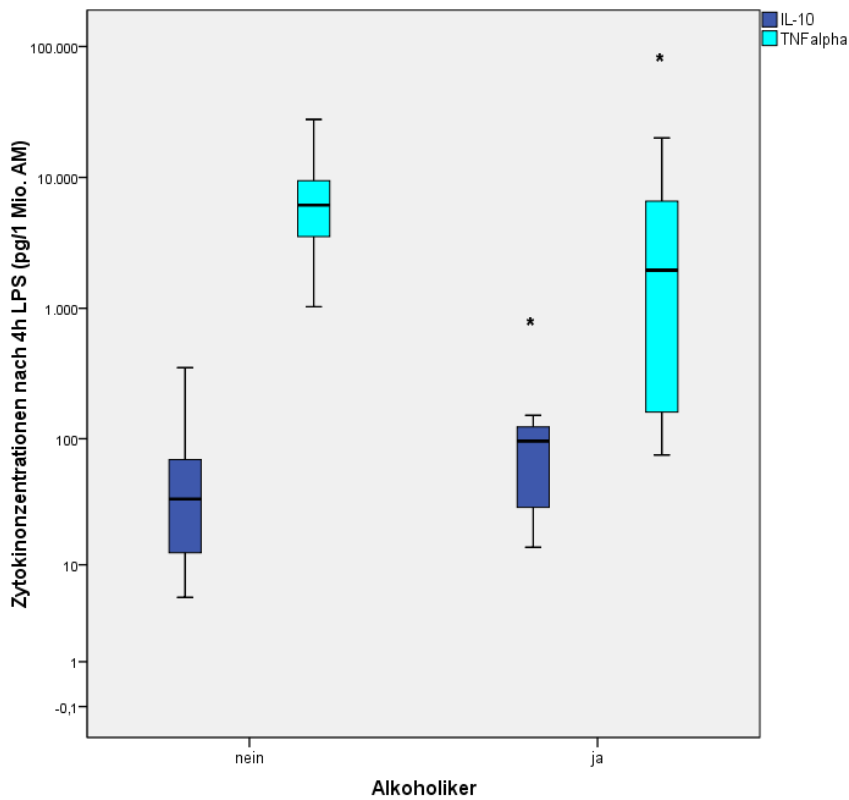


Abbildung 10: Signifikante Zytokinkonzentrationen (pg/1 Mio. AM) nach 4h LPS Stimulation

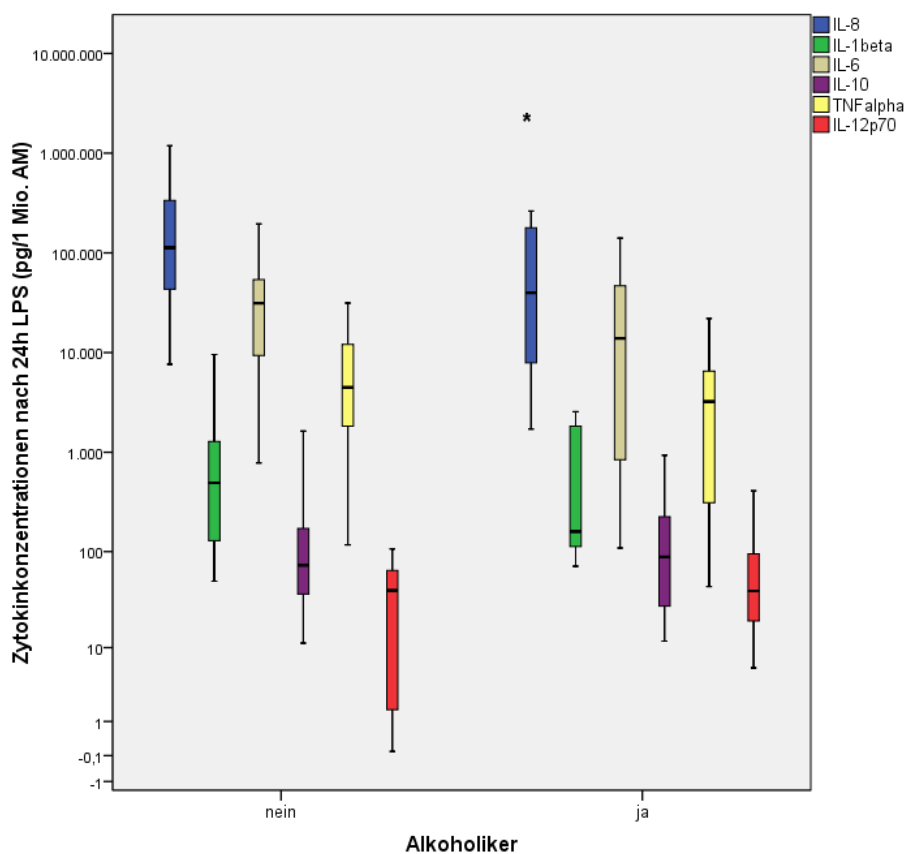
Tabelle 10: Signifikanzen nach 4h LPS Stimulation

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
IL-10	33,97 (10,83 / 68,91)	96,05 (29,20 / 123,31)	0,039*
TNF- α	6141,11 (3076,21 / 9973,63)	2034,55 (160,28 / 6588,86)	0,05*

n=Patientenanzahl; Zytokinkonzentrationen in $\text{pg}/10^6\text{AM}$ angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

4.2.2.3 Zytokine in BAL nach 24h LPS Stimulation

Nach 24h LPS-Stimulation erreichte IL-8 Signifikanzniveau. IL-8 war dabei in der AUD-Gruppe erniedrigt.

**Abbildung 11:** Zytokinkonzentrationen ($\text{pg}/10^6\text{AM}$) nach 24h LPS Stimulation

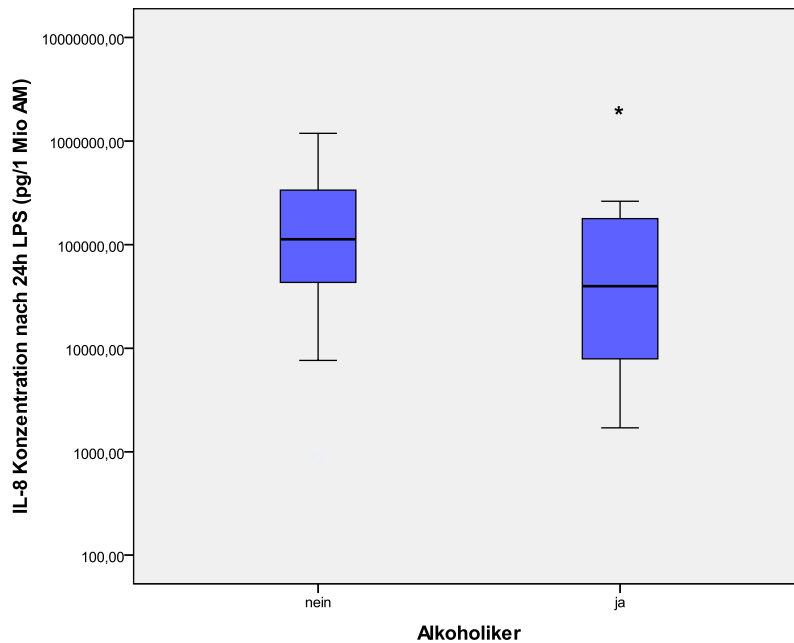


Abbildung 12: IL-8 nach 24h LPS Stimulation (pg/10⁶ AM)

Tabelle 11: Signifikanzen nach 24h LPS Stimulation

	nAUD (n=31)	AUD (n=15)	p
IL-8	112769,30 (38882,32 / 345782,13)	44805,52 (7909,95 / 178510,18)	0,05*

n=Patientenzahl; Zytokinkonzentrationen in pg/10⁶AM angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

4.3 Einfluss von Zigarettenrauch auf die Funktion der AM

Um den Einfluss von *chronischem* Alkoholkonsum ohne den Störfaktor Nikotin bzw. Zigarettenrauch und vice versa die isolierte Wirkung von Zigarettenrauch auf das Immunsystem der Lunge besser charakterisieren zu können, wurden weitere Subgruppen gebildet:

Tabelle 12: Subgruppen

	nAUD	AUD
Nichtraucher	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)
Zigarettenraucher	Gruppe B (n=15)	Gruppe D (n=11)

4.3.1 Raucher nAUD (B) vs. Raucher AUD (D)

Von 15 Patienten der AUD-Gruppe waren 11 aktive Raucher (Gruppe D). Ihnen gegenüber standen 15 aktive Raucher in der Gruppe B. Zwischen beiden Subgruppen gab es weder bei TLR-2 und -4 noch HLA-DR Unterschiede.

Tabelle 13: Subgruppenanalyse Gruppe B vs. Gruppe D

	nAUD	AUD
Nichtraucher	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)
Zigarettenraucher	Gruppe B (n=15)	Gruppe D (n=11)

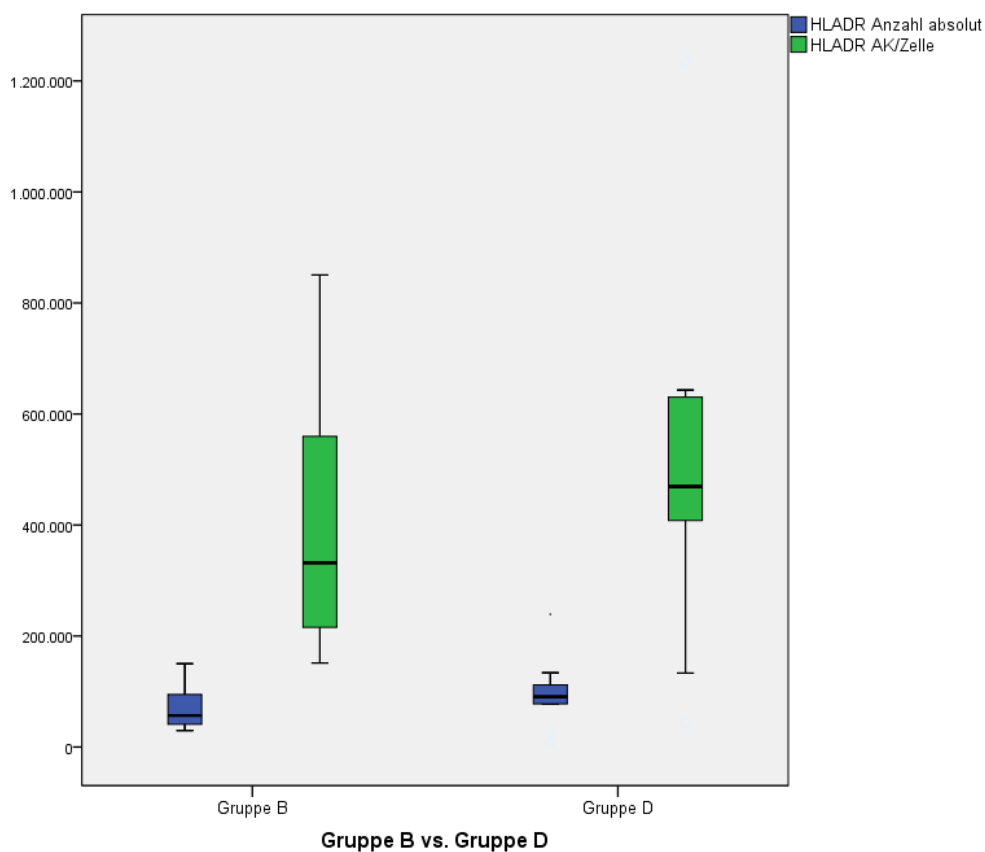


Abbildung 13: HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ

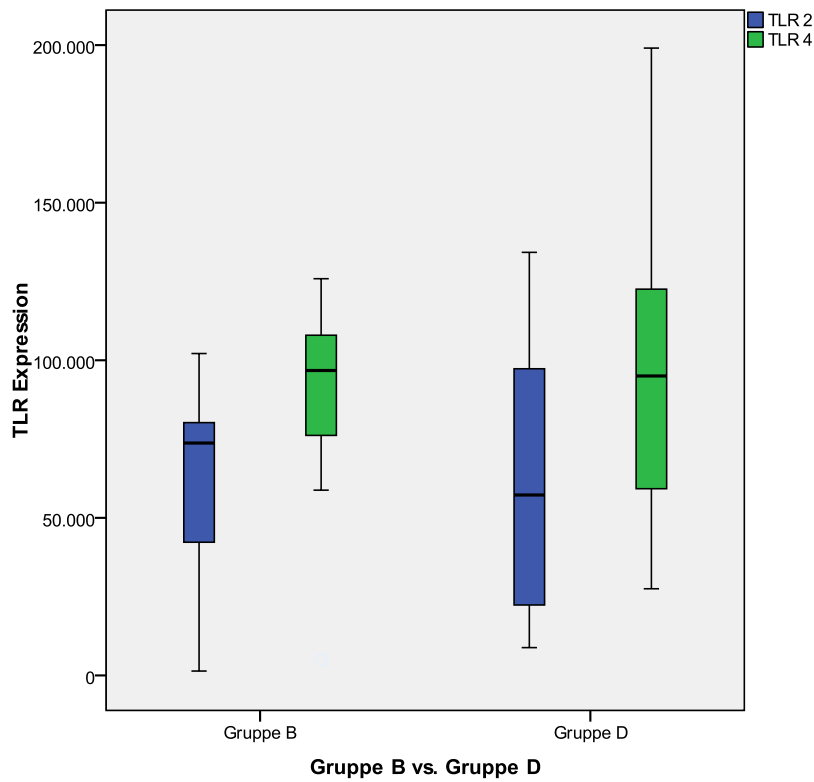


Abbildung 14: TLR 2- und 4 Expression auf den AM gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units)

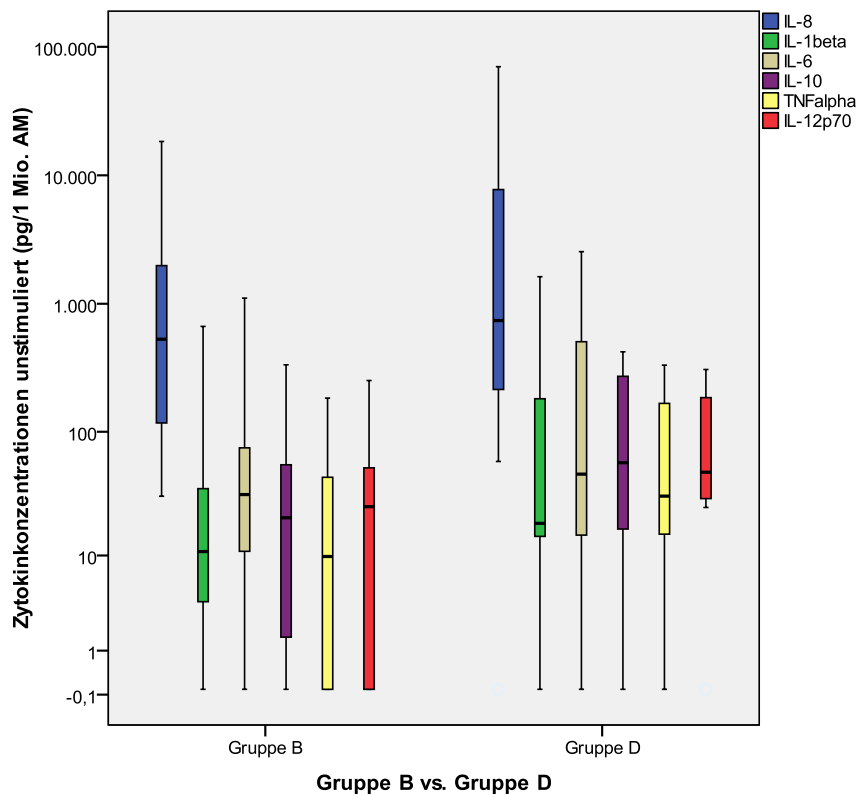


Abbildung 15: Zytokine unstimuliert (pg/10⁶ AM)

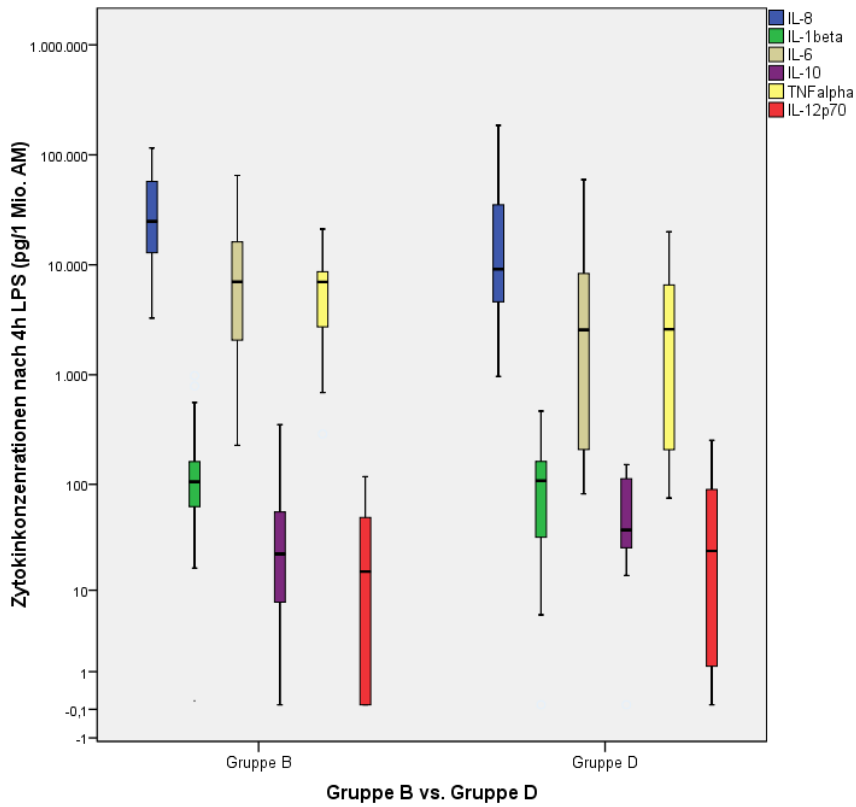


Abbildung 16: Zytokine nach 4h LPS Stimulation (pg/10⁶. AM)

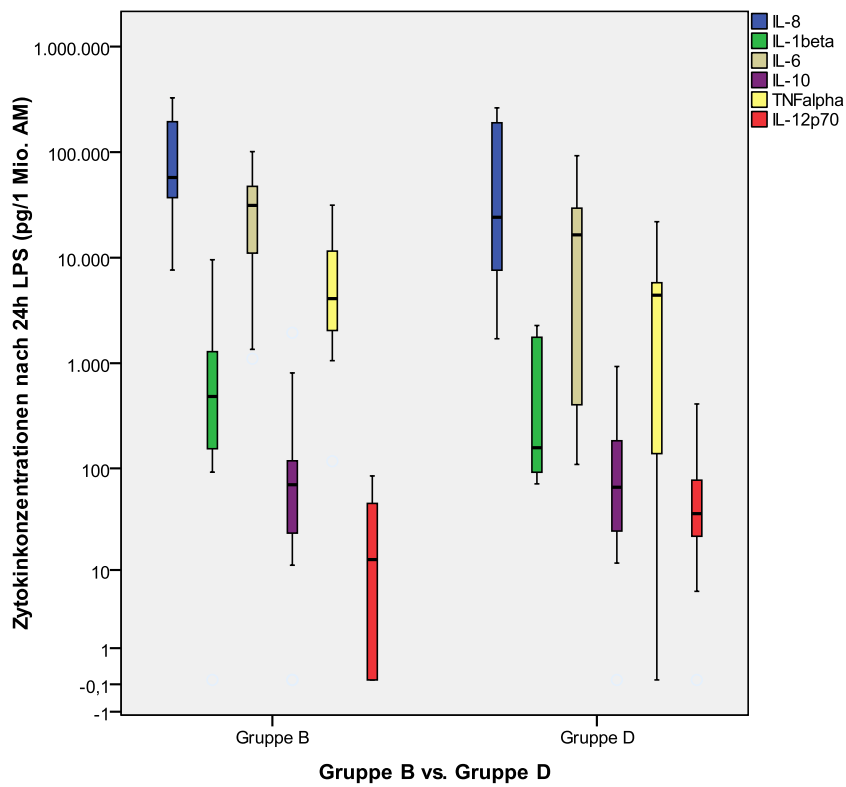


Abbildung 17: Zytokine nach 24h LPS Stimulation (pg/10⁶ AM)

4.3.2 Nichtraucher nAUD (A) vs. Raucher nAUD (B)

Tabelle 14: Subgruppenanalyse Gruppe A vs. Gruppe B

	nAUD	AUD
Nichtraucher	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)
Zigarettenraucher	Gruppe B (n=15)	Gruppe D (n=11)

Um mögliche Einflüsse der Zigaretteninhalation isoliert betrachten zu können wurden die Nichttrinkergruppe (nAUD) in zwei Untergruppen nach Raucher und Nichtraucher aufgeteilt (Gruppe A und B). Die TLR-2 und -4 Expression war in der Rauchergruppe B (n=15) gegenüber den Nichtrauchern A (n=16) signifikant erhöht. In Kontrast dazu waren die Anzahl an HLA-DR-Antigenen in der Rauchergruppe B signifikant gegenüber der Nichtrauchergruppe A erniedrigt. Bezüglich der Zytokinkonzentrationen konnten keinen Signifikanzen ermittelt werden.

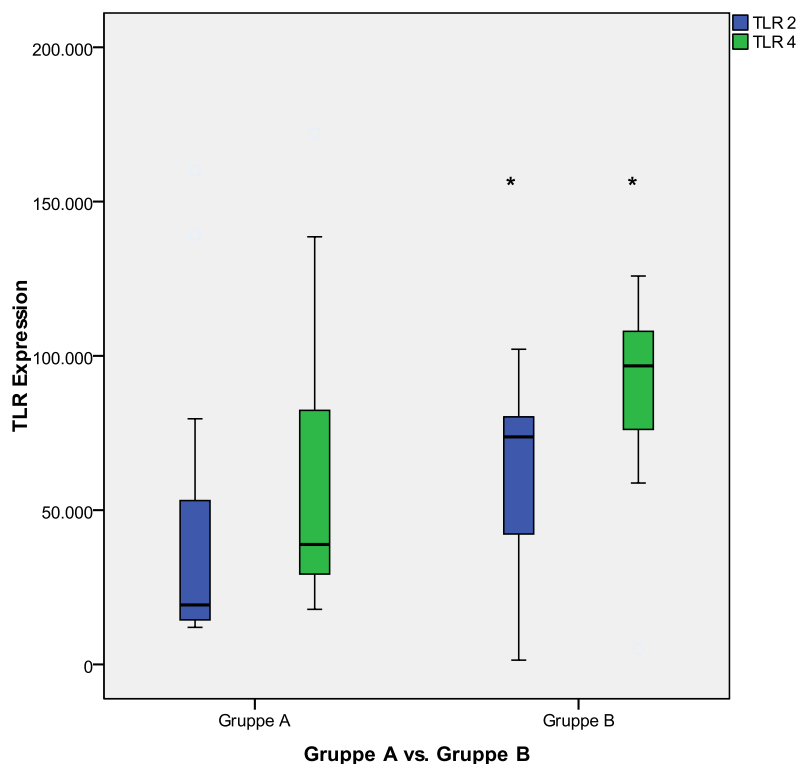
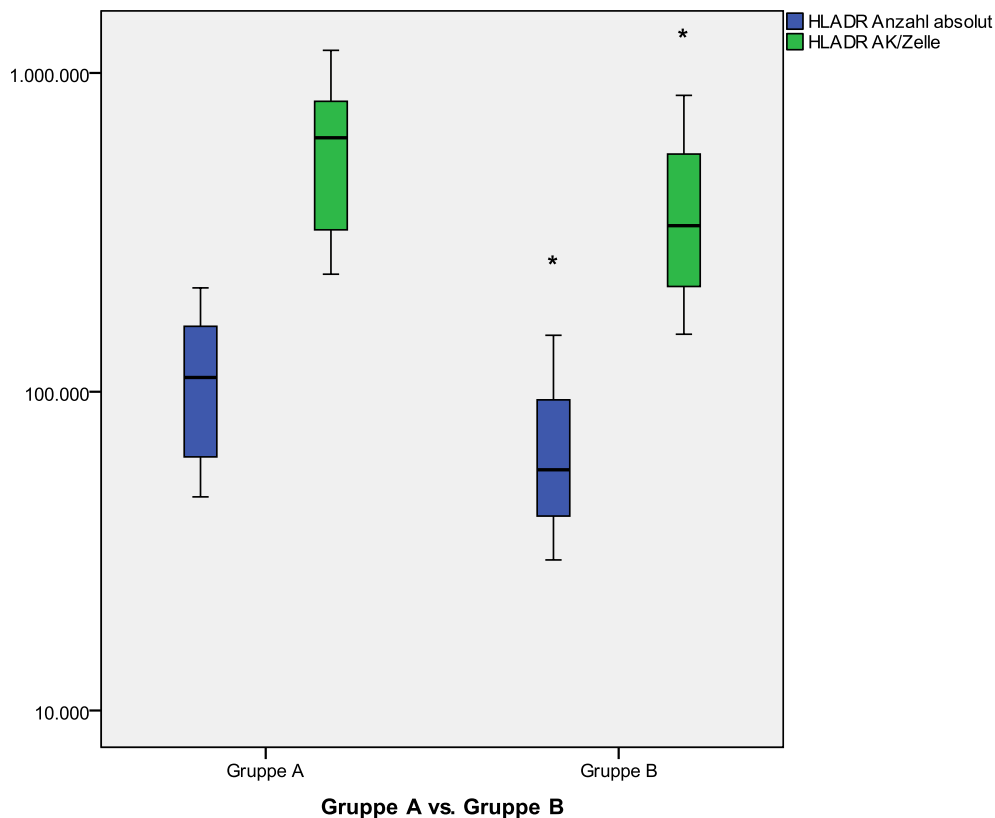


Abbildung 18: TLR Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units)

Tabelle 15: Signifikanzen der TLR Expression der Gruppe nAUD zwischen Rauchern und Nichtrauchern

	Gruppe A (n=16)	Gruppe B (n=15)	p
TLR 2	19275,5 (14356,25 / 64068,75)	73738,0 (41007,0 / 81714,0)	0,019*
TLR 4	38876,0 (41007,0 / 81714,0)	96754,0 (69649,0 / 111655,0)	0,030*

n=Patientenanzahl; TLR Expression angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

**Abbildung 19:** HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ**Tabelle 16:** Signifikanzen der HLA-DR Expression Gruppe nAUD zwischen Rauchern und Nichtrauchern

	Gruppe A (n=16)	Gruppe B (n=15)	p
HLA-DR absolut	110843,0 (61311,0 / 162715,25)	56094,0 (36475,0 / 102858,0)	0,007*
HLA-DR AK/Zelle	627036,0 (315347,75 / 829408,25)	331818,0 (188669,0 / 611759,0)	0,027*

n=Patientenanzahl; HLA-DR Expression absolut und in Antikörper pro Zelle angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

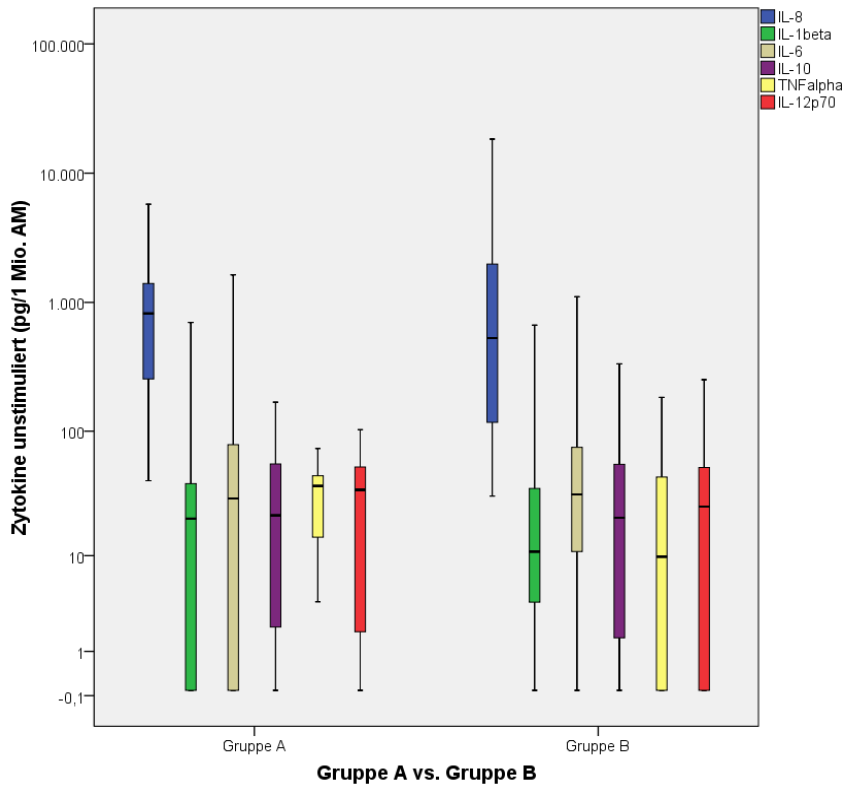


Abbildung 20: Zytokine (pg/10⁶ AM) ohne LPS Stimulation

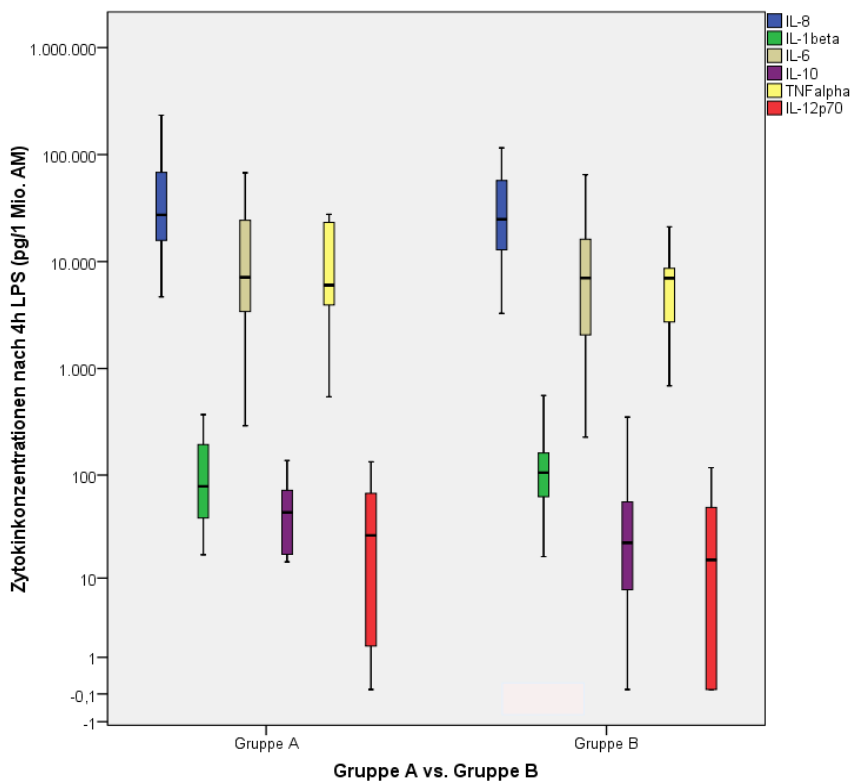


Abbildung 21: Zytokine nach 4h LPS-Stimulation (pg/10⁶ AM)

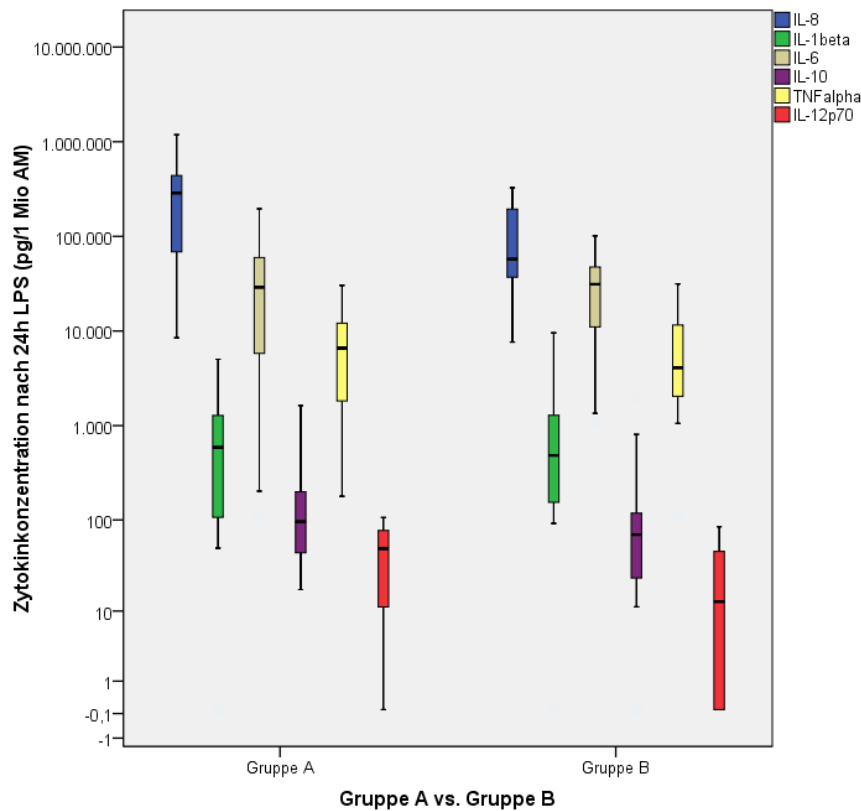


Abbildung 22: Zytokine nach 24h LPS-Stimulation (pg/10⁶ AM)

4.3.3 Nichtraucher nAUD (A) vs. Nichtraucher AUD (C)

In einer weiteren Subgruppenanalyse wurde abschließend die nAUD-Gruppe der Nichtraucher mit der AUD-Gruppe der Nichtraucher (Gruppen A und C) verglichen. Zwischen den Nichtrauchern der Alkoholgruppe (Gruppe C) und den Nichtrauchern der Nichtalkoholgruppe (Gruppe A) gab es bei HLA-DR, TLR-2 und TLR-4 keine Signifikanzen. 4 aktuellen Nichtrauchern (ehemalige Raucher wurden inkludiert) in Gruppe C standen 16 Nichtraucher der Gruppe A gegenüber.

Tabelle 17: Subgruppenanalyse Gruppe A vs. Gruppe C

	nAUD	AUD
Nichtraucher	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)
Zigarettenraucher	Gruppe B (n=15)	Gruppe D (n=11)

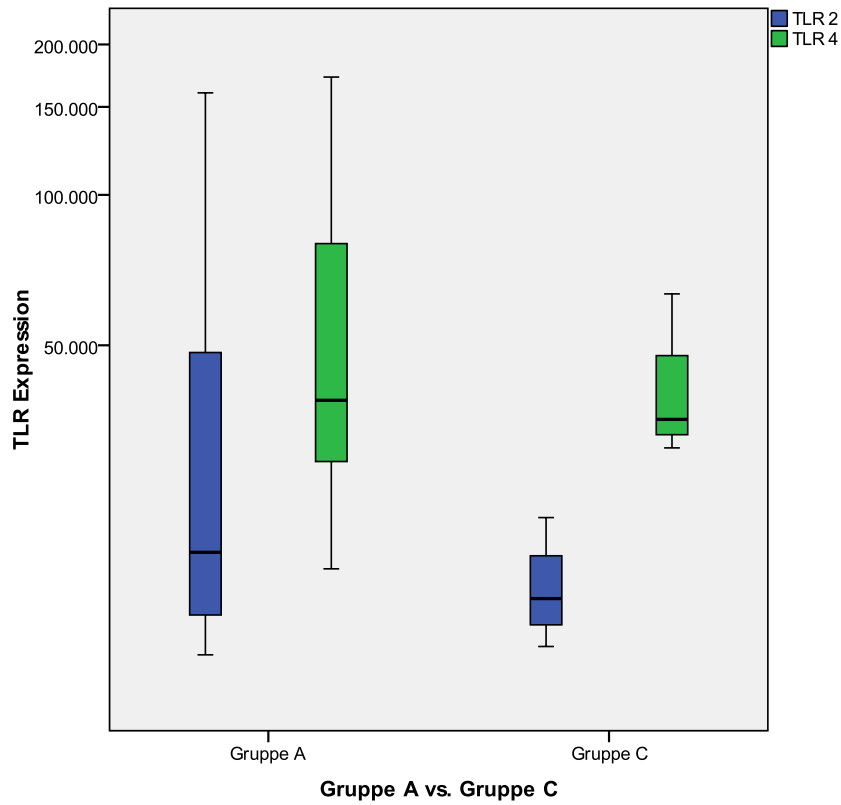


Abbildung 23: TLR Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units)

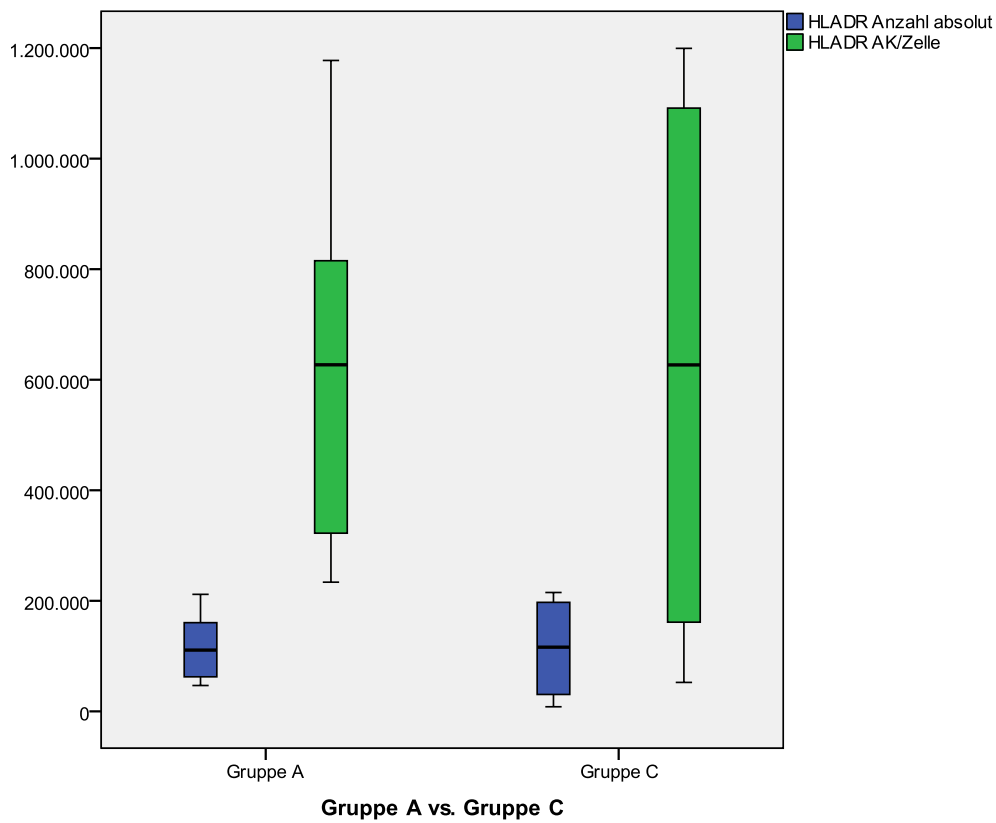


Abbildung 24: HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ

Dagegen gab es im Vergleich der Nichtraucher beider Gruppen mehrere Signifikanzen im Bereich der Zytokinkonzentrationen. Bei den unstimulierten Alveolarmakrophagen der BALF waren die pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-1 β sowie IL-6 in der AUD Gruppe C (n=4) signifikant erhöht.

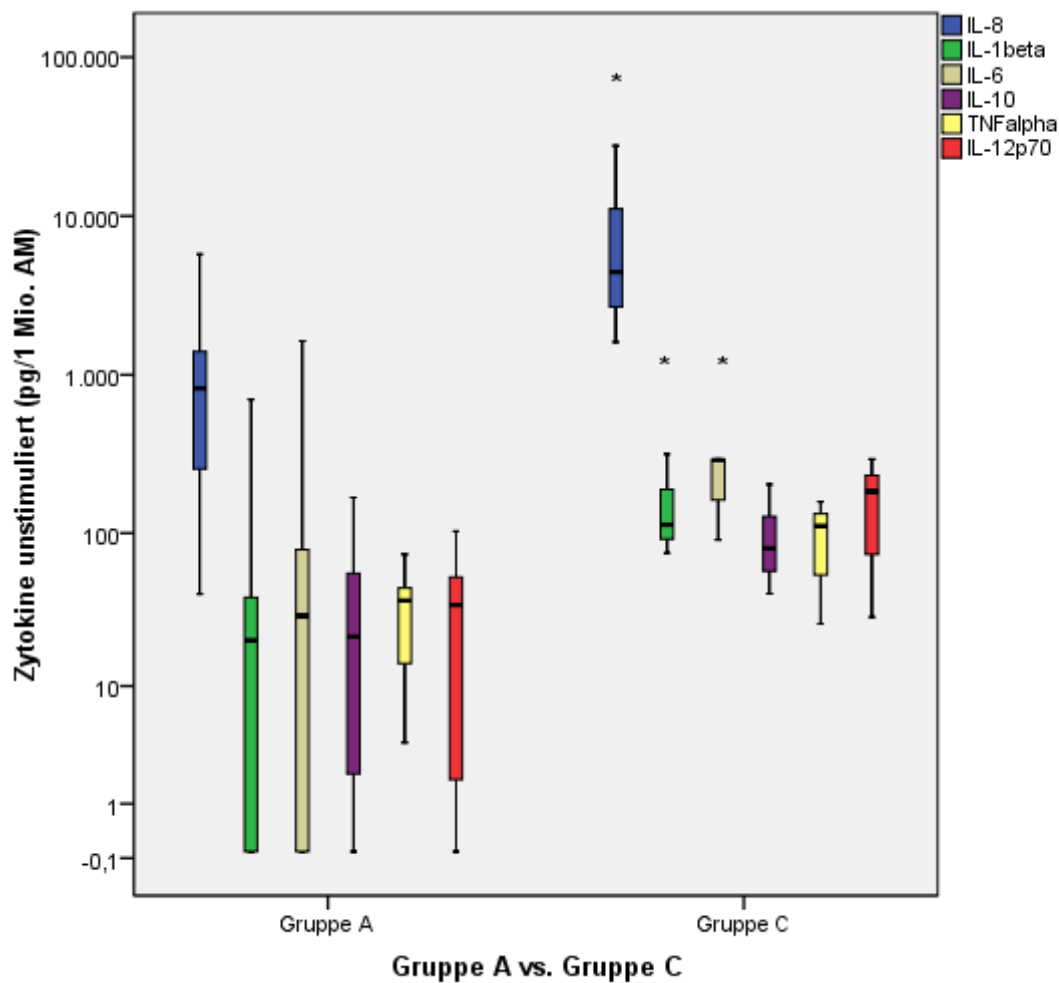


Abbildung 25: Zytokinkonzentrationen (pg/10⁶ AM) ohne LPS Stimulation

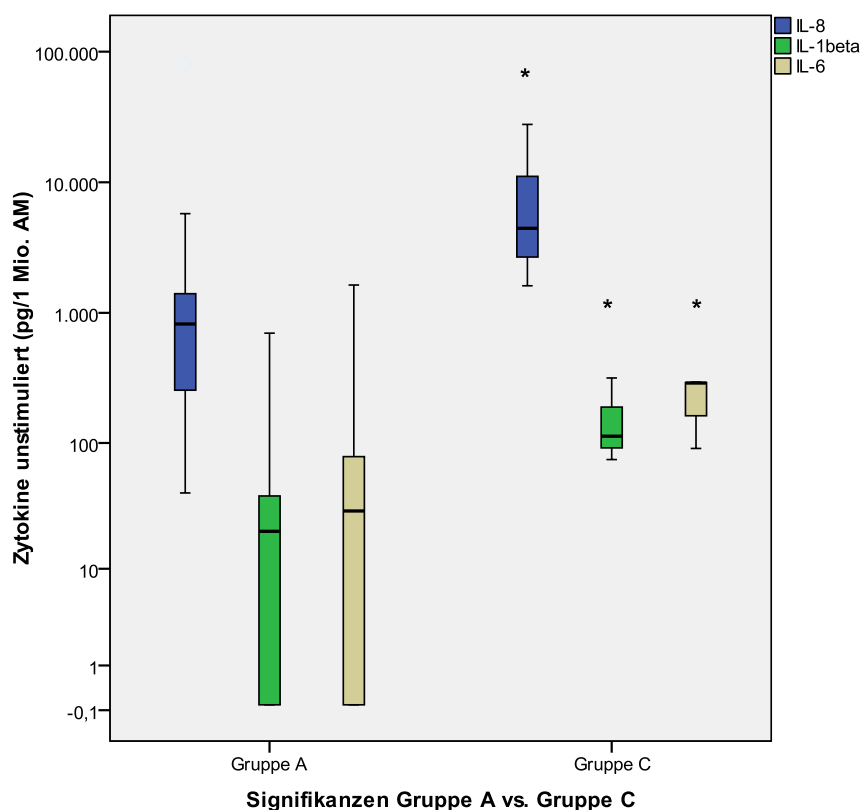


Abbildung 26: Signifikante Zytokine (pg/10⁶ AM) ohne LPS Stimulation

Tabelle 18: Signifikanzen unstimulierter Zytokine der Nichtraucher beider Gruppen

	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)	p
IL-8	822,75 (248,90 / 1405,94)	4442,49 (1612,54 / -)	0,033*
IL-1β	20,35 (0,00 / 38,92)	112,80 (74,40 / -)	0,023*
IL-6	29,51 (0,00 / 81,32)	289,59 (90,71 / -)	0,047*

n=Patientenanzahl; Zytokinkonzentrationen in pg/10⁶AM angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

Nach der 4h LPS Stimulation war IL-10 in der AUD-Gruppe der Nichtraucher (Gruppe C) als einziges Zytokin signifikant verändert – nämlich erhöht. Ebenfalls im Gruppenvergleich erhöhte Werte, wenngleich nicht signifikant, zeigten alle restlich bestimmten Zytokine. Mit einer Ausnahme: TNF-α war in der AUD-Gruppe tendenziell erniedrigt. Zwar konnte hier keine Signifikanz ermittelt werden, jedoch bewegten sich die TNF-α Level in ähnliche Richtung der Gesamtergebnisse zwischen AUD und nAUD.

Nach den 24h Stimulationen konnten bezüglich der Zytokinkonzentrationen keine weiteren signifikanten Unterschiede gefunden werden.

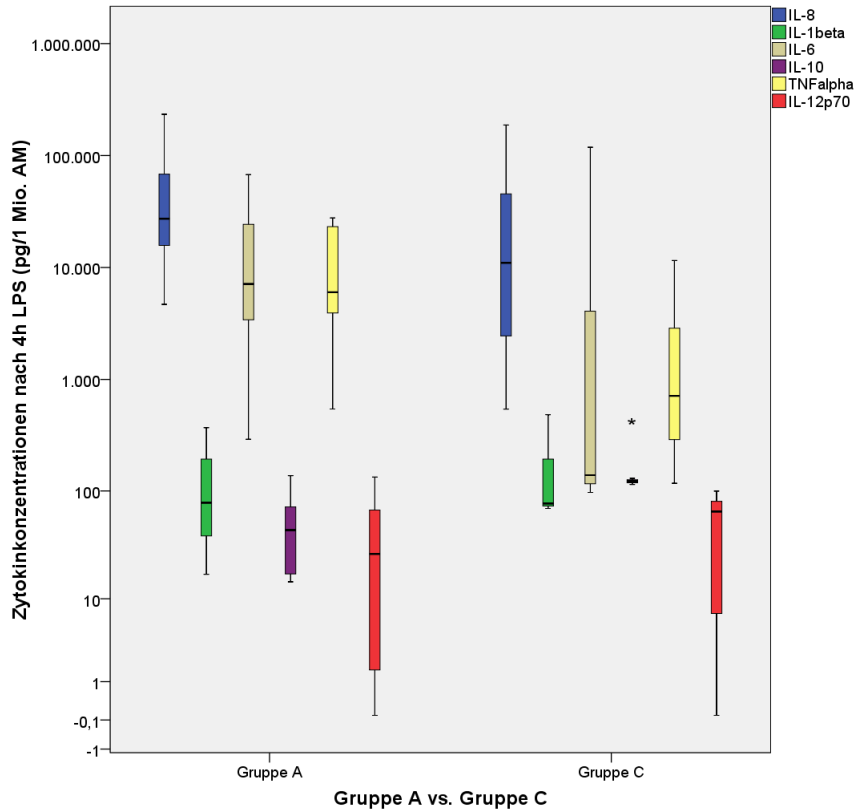


Abbildung 27: Zytokinkonzentrationen nach 4h LPS (pg/10⁶ AM)

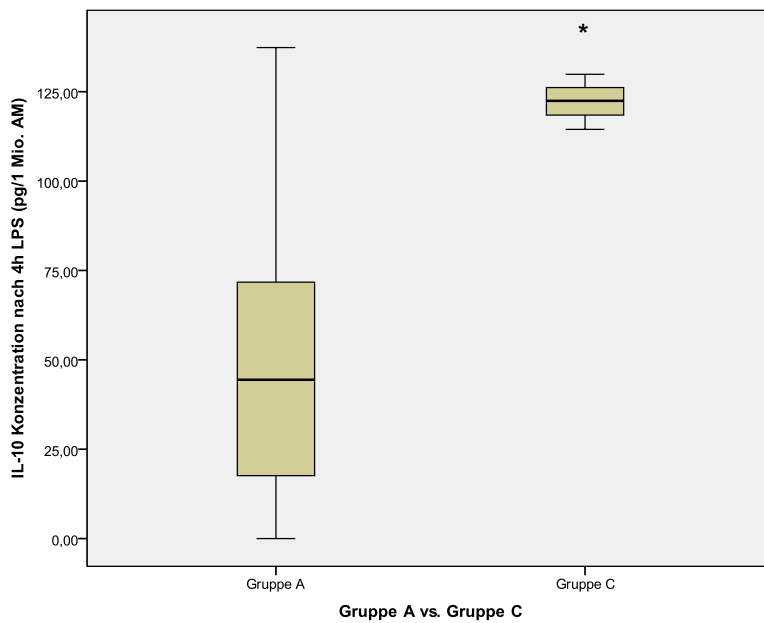


Abbildung 28: Konzentration von IL-10 nach 4h LPS (pg/10⁶ AM)

Tabelle 19: Signifikanz IL-10 nach 4h LPS Stimulation

	Gruppe A (n=16)	Gruppe C (n=4)	p
IL-10	44,42 (16,10 / 73,14)	122,45 (114,46 / -)	0,014*

Zytokinkonzentrationen in pg/10⁶AM angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

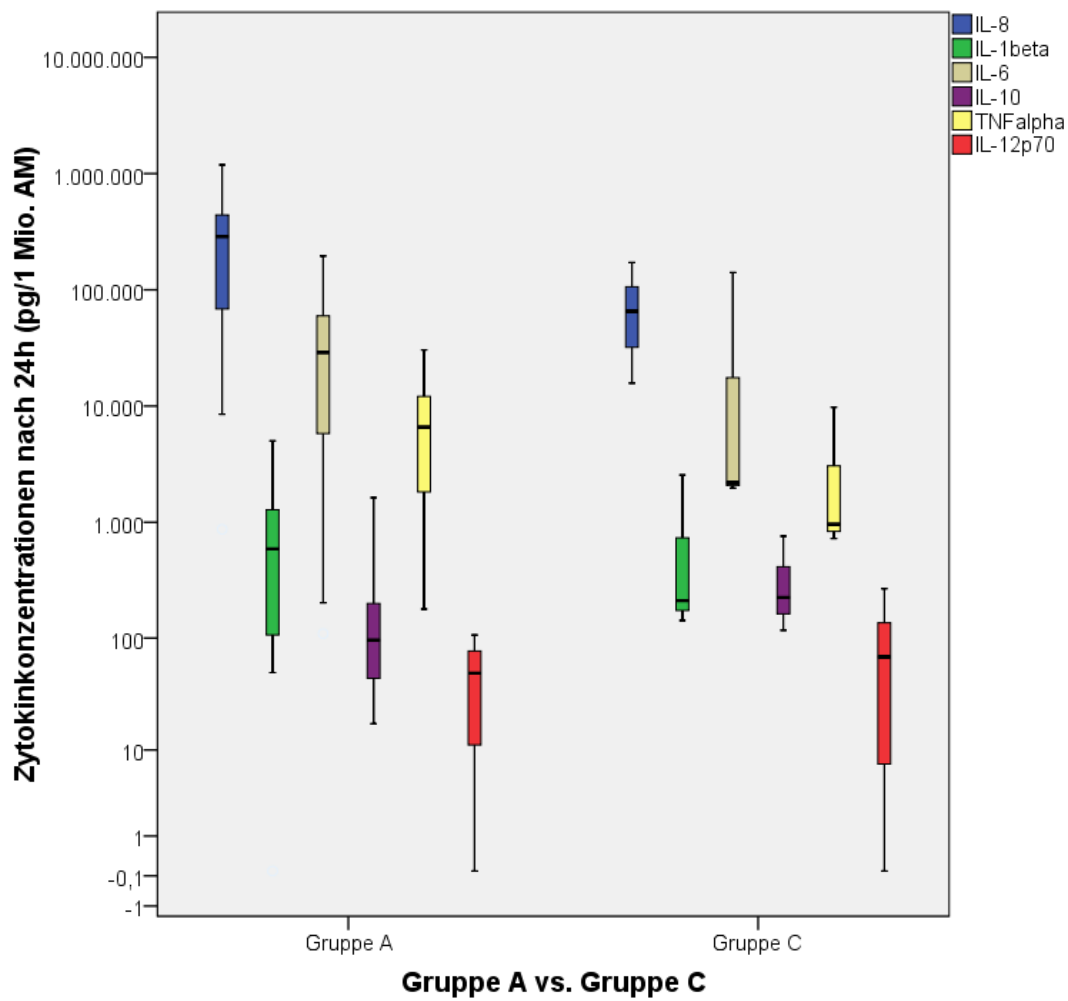


Abbildung 29: Zytokinkonzentrationen nach 24 LPS (pg/10⁶ AM)

5. Diskussion

Aus der vorliegenden Arbeit geht als wichtigste Erkenntnis hervor, dass *chronischer* Alkoholkonsum bei Panendoskopiepatienten die Funktion der Alveolarmakrophagen, gemessen als Zytokinkonzentrationen aus der BALF, verändert – auch unabhängig von der Partizipation des Co-Faktors Zigarettenrauch.

In der AUD-Gruppe waren in der BALF, gewonnen unmittelbar vor der Panendoskopie, die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-12p70, sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 signifikant erhöht. Die Raucher exkludiert, zeigte sich, dass bei den nichtrauchenden Alkoholikern die Zytokine IL-8, IL-1 β und IL-6 aus der unstimulierten BALF gegenüber den nichtrauchenden Nichttrinkern erhöht waren. Die Zytokinantwort auf die LPS-Stimulation *ex vivo* scheint durch *chronischen* Alkoholkonsum ebenfalls beeinflussbar zu sein. In der Alkoholgruppe wurden nach 4h LPS Stimulation analog pro- und antiinflammatorische Zytokine TNF- α und IL-10 signifikant moduliert (TNF- α war erniedrigt und IL-10 erhöht), während nach 24h das Chemokin IL-8 signifikant erniedrigt gemessen wurde. Bei den nichtrauchenden Alkoholkonsumenten (Gruppe C) konnte wiederum eine Erhöhung der anti-inflammatorischen Zytokinsekretion von IL-10 nach 4h LPS-Stimulation festgestellt werden im Vergleich zu den „nichtrauchenden Nichttrinkern“ (Gruppe A). Außerdem zeigte sich bei allen rauchenden Patienten aus der „Nichttrinkergruppe“ (Gruppe B) gegenüber der „nichtrauchenden“ Gruppe A der „Nichttrinker“ die Zelloberfläche der Alveolarmakrophagen hinsichtlich der HLA-DR-, TLR-2- und TLR-4-Präsenz signifikant modulierbar, während Zigarettenrauch in Kombination mit *chronischem* Alkoholkonsum darauf keinen Einfluss zu haben scheint. Eine signifikante Zytokinmodulation in der BALF allein durch Zigarettenrauch konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

5.1 HLA-DR, TLR-2, TLR-4 und Alkohol

Unsere Ergebnisse zeigten eine tendenzielle Verminderung der HLA-DR-Expression. Zur Quantität von HLA-DR auf den Alveolarmakrophagen bei Alkoholikern konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden. Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Studien, in denen das Zusammenspiel von HLA-DR auf den AM bei diversen Lungenerkrankungen

untersucht wurde. So können Erkrankungen wie Sarkoidose zu erhöhten HLA-DR-Werten führen, während Pneumonien zu einer verringerten Expression führten [60, 62]. Die TLR-2- und TLR-4-Expression wiesen keine signifikanten Veränderungen zwischen der Kontrollgruppe und der Genussmittel-Gruppe auf. Einige wenige publizierte Studien zeigen bisher ein kontroverses Bild der Rolle von *akutem* Alkoholeinfluss auf die Toll-like-Rezeptoren von Zellen in der Lunge bzw. des Atemtraktes auf. Bailey et al. demonstrierten 2009 und 2010 an einer Reihe von Epithelialzellen aus den Atemwegen, dass *akute* Alkoholgabe eine erhöhte TLR-2 mRNA und deren Proteine induzieren kann, sobald die Zellen mit biologisch relevanten Mengen an Ethanol in Verbindung kamen. Dies könnte ein möglicher Entstehungsgrund für die alkoholgetriggerte, schwere Bronchitis sein [69]. Oak et al. konnten zeigen, dass die *akute* Alkoholaufnahme die TLR-4 induzierte TNF- α Produktion durch Monozyten signifikant verminderte, während über TLR-2 allein TNF- α nicht vermindert wurde. Interessanterweise konnte *akuter* Alkohol über die Präsenz beider Costimulatoren, also TLR-2 und -4 auf Monozyten TNF- α erhöhen [68]. Dem gegenüber erhöhte *akuter* Alkohol die IL-10 Produktion über den TLR-4 Weg, während die simultane Präsenz von TLR-2 und -4 zu einer Verminderung der IL-10 Produktion durch Monozyten führte [67, 68]. Die alkoholinduzierten Änderungen der IL-10-Produktion waren entgegengesetzt der Änderungen von TNF- α , was darauf hindeutet, dass *akuter* Alkohol das allgemeine inflammatorische Zytokinprofil von Monozyten verändern kann. Die gegensätzliche Stimulation von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen durch *chronischen* gesundheitsgefährdenden Alkoholkonsum in Richtung Th2 Dominanz konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Es kommt dabei jedoch nicht zu einer signifikanten Änderung der TLR-Präsenz auf den AM zwischen beiden Gruppen. Eine weitere Studie zeigte, dass TLR-4 Knockout-Mäuse deutlich weniger Entzündungszeichen in der Lunge nach *akuter* Alkoholgabe und dem Zufügen von Verbrennungsverletzungen aufwiesen. TLR-2 Knockout Mäuse wiederum zeigten keinen Unterschied zu herkömmlichen Mäusen [71].

Keine Daten in der Literatur wurden hingegen für die Wirkung von *chronischem* Alkoholkonsum bezüglich der Regulierung von TLR auf den humanen AM gefunden. In der vorgelegten Studie konnte eher eine Depression der TLR-2 und -4 Moleküle auf den AM unter *chronischem* Alkohol beobachtet werden, wenn auch ohne jegliche statistische Signifikanz. Die kumulierten Ergebnissen zeigen sich im Widerspruch zu den bisherigen Daten bezüglich *akutem* Alkoholeinfluss auf die TLR-Regulierung [69]. Wenngleich bisherige Beobachtungen, wie bereits erwähnt, ausschließlich an Mäusen oder

Epithelialzellen aus den Atemwegen und unter *akutem* Alkoholeinfluss getätigt wurden. Somit fällt es schwer, eine inhaltliche Vergleichsebene herzustellen, da *chronischer* gegenüber *akutem* Alkoholkonsum in vielen Studien gegensätzliche Wirkung auf die Immunantwort gezeigt hat [53]. Zudem gibt es im Tiermodell keine klare Definition über die Dauer der Alkoholaufnahme, um die Wirkung von *chronischem* Alkoholeinfluss auf den Menschen angemessen zu simulieren [2]. Die mittels Immunfluoreszenz gemessene Dichte der Toll-like-Rezeptoren-2 und -4 auf den AM wurden in vorliegender Arbeit jedenfalls durch *chronischen*, gesundheitsgefährdenden Alkoholkonsum nicht signifikant moduliert. Direkte Rückschlüsse auf die Zytokinproduktion wie durch Oak et al. beschrieben via dem TLR-2 und -4 Signalweg können mit dieser Arbeit nicht gezogen werden. Offenbar kann Alkohol den TLR-Signalweg verändern. Jedoch konnte die Quantität an Toll-like-Rezeptoren auf den AM in dieser Versuchsreihe nicht signifikant durch *chronischen*, überhöhten Alkoholkonsum verändert werden.

5.2 Zytokine und chronischer Alkoholkonsum

Wie bereits mehrfach erwähnt, existieren nur sehr wenige klinisch experimentelle Studien in denen die Zytokinveränderungen in der BALF unter Alkoholeinfluss beobachtet wurden. Zudem wurde meist der Einfluss von *akutem* Alkoholkonsum auf die Lunge untersucht und nicht der von Langzeitalkoholkonsum. Zudem scheinen die Effekte von *chronischem* und *akutem* Alkoholkonsum auf das Immunsystem sich voneinander zu unterscheiden und sollten daher eher getrennt voneinander betrachtet werden [53]. Einige Autoren konkludieren, dass *akuter* Alkoholeinfluss die proinflammatorische Immunantwort drosselt, während *chronischer* Alkoholgenuss wohl die Immunantwort zu verstärken vermag [68]. Wie auch immer, in der vorliegenden Studie waren sämtliche Zytokinkonzentrationen der AUD-Gruppe ohne LPS Stimulation und Inkubation gegenüber der nAUD erhöht, wenngleich 3 Zytokine Signifikanzniveau erreichten (vgl. Abbildung 7): IL-1 β , IL-10 und IL-12p70 waren *ex vivo* unstimuliert in der AUD-Gruppe signifikant erhöht. Nach 4h LPS Stimulation war IL-10 signifikant erhöht, während TNF-alpha signifikant reduziert war. Nach 24 h LPS Stimulation konnte das Chemokin IL-8 ebenfalls signifikant erniedrigt gemessen werden. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie unterstreichen die Potenz von *chronischem* Alkoholkonsum, die Immunantwort in der menschlichen Lunge zu verändern. Dabei scheint basal die Konzentration sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine in der Lunge von Alkoholikern erhöht, was ein

verstärktes immunologisches Reaktionsgeschehen in der menschlichen Alkoholikerlunge gegenüber Nichttrinkern abbilden könnte. Zudem erscheint kurzfristig (nach 4h LPS Stimulation) nach Pathogenkontakt die antiinflammatorische Potenz erhöht zu Lasten der Proinflammation. Dies könnte ein wichtiger Hinweis auf die Genese der erhöhten Morbidität und Mortalität bezüglich pulmonaler Infekte bei *chronischen* Alkoholikern sein. Auch nach 24h LPS Stimulation war mit IL-8 ein weiteres wichtiges Zytokin für die proinflammatorische Antwort signifikant in der Lunge erniedrigt. Somit scheint in der menschlichen Lunge durch *chronischen* Alkoholkonsum nach LPS Stimulation ein Shift von Th1 Zytokinen (Pro-inflammation) zu Th2 Zytokinen (Anti-inflammation) beobachtbar. Wie bereits erwähnt ist interessanterweise basal, also ohne LPS-Stimulation, grundsätzlich sowohl das pro- als auch antiinflammatorische Zytokinprofil in der Lunge bei Alkoholabutikern gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Der Th2 Shift erfolgt erst im Verlauf nach bzw. durch LPS-Kontakt im Vergleich zur nAUD-Gruppe.

5.2.1 Interleukin-1 β

Ältere Ergebnisse decken sich nicht bzw. bedingt bezüglich des *akuten* als auch *chronischen* Alkoholkonsums mit den Vorliegenden dieser Arbeit. D'Souza El-Guindy et. al zeigten im Rattenmodell, dass die IL-1 β Konzentration in der BAL durch *akuten* Alkohol nach LPS-Stimulation beeinträchtigt wird [53]. Auch konnte 1995 in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass die AM von schweren, *chronisch* alkoholischen Leberzirrhotikern (n=13 von insgesamt 29) und nach Lipopolysaccharid-Stimulation signifikant weniger IL-1 β sezernierten als die gesunde Kontrollgruppe (n=12) [38, 47]. In einer weiteren Subgruppe bestehend aus den restlichen 16 Leberzirrhotikern „leichterer Natur“ von insgesamt 29 Patienten mit *chronischem* Alkoholkonsum konnten jedoch keine Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe gefunden. In dieser Arbeit wurden allerdings Leberzyrrhotiker explizit ausgeschlossen, da die Zytokinproduktion- bzw. Sekretion immer in Verbindung mit der Clearance beurteilt werden sollte [76]. Verminderte Zytokinspiegel könnten auch lediglich ein Ausdruck einer erhöhten Clearance sein und vice versa. Bei Leber- und Nierenerkrankungen ist es demnach von praktischer Bedeutung verminderte Spiegel von Zytokinen mit verminderter Freisetzung zu korrelieren bzw. umgekehrt mit erhöhter Clearance [115]. IL-1 β konnte in der vorliegenden Arbeit in der unstimulierten BAL der AUD-Gruppe als signifikant erhöht

gemessen werden. Nach 4h bzw. 24h LPS-Stimulation zeigten sich keine statistisch relevanten Veränderungen gegenüber der Nichtalkoholiker-Gruppe.

5.2.2 IL-6

Die Datenlage hinsichtlich IL-6 in der Lunge unter Alkoholeinfluss zeigte bisher eher einen inhibierenden Effekt auf die Expression und Sekretion durch *akuten* Alkoholeinfluss [53]. *Akuter* Alkoholeinfluss ist in der Lage *in vitro* die IL-6 Synthese durch Makrophagen zu inhibieren [78]. Ferner vermindert *akuter* Alkoholeinfluss in der Studie von D´Souza El-Guindy et al. sowohl die IL-6 mRNA Expression als auch die IL-6 Sekretion in der Lunge [53]. Zudem wird die IL-6 Sekretion der AM bei einem Teil von alkoholischen Leberzyrhotikern gegenüber Gesunden verringert [47]. Spies et al. konnten 2008 in einem Mausmodell jedoch zeigen, dass *subchronischer* Alkoholeinfluss über 8 Tage IL-6 in der Lunge signifikant erhöht [12]. Zwar zeigten sich in vorliegender Arbeit keine Signifikanzen, aber die Konzentration von IL-6 basal war eher tendenziell erhöht. Nach 4 und 24h LPS Stimulation im Vergleich zur nAUD-Gruppe verringerte sich der IL-6 Spiegel tendenziell gegenüber der Kontrollgruppe, wenn auch ohne jegliche Signifikanzen. Somit zeigt sich die verminderte Fähigkeit der AM nach LPS-Kontakt IL-6 freizusetzen in der Lunge eher im Einklang mit der Mehrzahl an bereits veröffentlichten Daten zur *akuten* Alkoholaufnahme und untermauert die immunsupprimierende Wirkung von *chronischem* Alkohol auf die Lunge, wenn auch nicht signifikant.

5.2.3 TNF- α

Die Rolle von TNF- α bezüglich der Immundefizienz und erhöhten Infektneigung bei Alkoholmissbrauch ist in mehreren Studien bereits gut untersucht worden. Ein zellulärer Mechanismus der sich für diesen Effekt verantwortlich zeigt, ist die alkoholinduzierte Unterdrückung von TNF- α durch mononukleäre Phagozyten. Zhao et al. beschrieben, dass in humanen Monozyten durch *akuten* Alkoholeinfluss die LPS-induzierte TNF- α Sekretion posttranskriptional durch Hemmung der zellulären Prozessierung mittels TNF-alpha-Converting-Enzym (TACE) unterdrückt wird [116]. Eine weitere Arbeit bestätigte im Mausmodell, dass *akuter* Alkoholeinfluss die LPS-induzierte Konzentration von TNF- α in der Lunge von Mäusen sowohl posttranskriptional als auch posttranslational vermindert.

Die mRNA Expression von TNF- α bleibt jedoch davon unbeeinflusst [9, 53, 80, 81]. Dem gegenüber konnte eine Veränderung der TNF- α Rezeptorexpression durch *akuten* Alkoholkonsum im Tierexperiment gezeigt werden, so dass Alkohol neben der Zytokinsekretion auch die andere Seite des Signalweges, die des Rezeptors beeinflussen kann [53]. Die Datenlage zum Einfluss von *chronischem* Alkoholkonsum auf die pulmonale TNF- α Produktion ist dagegen kontrovers. Analog zum *akuten* Alkoholeinfluss gibt es im Tiermodell Hinweise für eine Verminderung von TNF- α , während andere Arbeiten eine Erhöhung der TNF- α Konzentrationen nach LPS Stimulation zeigen [9, 53, 81-83]. Zhang et al. berichten von einem erhöhenden Effekt auf die Produktion von TNF- α nach LPS und PMS Stimulation durch eine *in vitro* Studie an einer Monozytenzelllinie nach *chronischer* Alkoholgabe über einen Zeitraum von 7 Tagen [117]. Allerdings wurden wohlbemerkt keine Alveolarmakrophagen untersucht. Interessant war aber dabei die Beobachtung, dass initial 24h nach Alkoholgabe, also im *akuten* Setting, TNF- α nach Stimulation vorerst signifikant erniedrigt war. Ab dem 6. Tag der Alkoholfütterung wurde die TNF- α Produktion der untersuchten Mono Mac 6-Zellen durch Stimulation signifikant hochreguliert. Die Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen dieser Studie, die zeigen, dass auch *chronischer* Alkoholkonsum initial nach LPS Stimulation die Produktion von TNF- α inhibieren kann. Eine Erhöhung, wie von Zhang et al. beobachtet, von TNF- α nach *chronischer* Alkoholigestion an humanen Monozyten (6 – 7 Tage) konnte nicht beobachtet werden. Eine von Gosset et al. erwähnte Studie an Alkoholikern mit Leberzirrhose konnte bei 13 von 29 Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose einer verminderte Sekretion von TNF- α durch die AM aus der BAL nachweisen [47]. In der gleichen Studie zeigte sich allerdings bei *chronischen* Alkoholikern ohne Leberzirrhose kein Unterschied in der Zytokinproduktion zur „alkoholfreien“ Kontrollgruppe. Omidvari et al. konnten an 22 *chronischen* Alkoholikern eine Verminderung der TNF- α Konzentration in der BALF nach 24h LPS-Stimulation gegenüber der TNF- α Konzentration von 7 Gesunden ($p < 0,015$) beobachten [83]. Aus vorliegender Arbeit geht hervor, dass zwar TNF- α tendenziell in der unstimulierten BALF bei *chronischen* Alkoholikern erhöht ist, aber letztlich kein signifikanter Unterschied zu der Nichttrinkergruppe nachgewiesen werden kann. 4 Stunden nach LPS-Stimulation zeigte sich jedoch der TNF- α Spiegel der AUD-Gruppe signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Gros der bisher veröffentlichten Ergebnisse bezüglich des *akuten* als auch *chronischen* Alkoholkonsums. Offenbar wird durch *chronischen* Alkoholgenuss in der Frühphase nach Pathogenkontakt die pro-inflammatorische Immunantwort durch TNF- α in der Lunge reduziert. Nach 24h

LPS-Stimulation konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich TNF- α zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. In der Studie von Omidvari et al. konnte jedoch 24h nach LPS Stimulation eine Depression von TNF- α gemessen werden [83]. Eine vorzeitige Analyse nach 4 Stunden analog zu vorliegender Arbeit wurde nicht vorgenommen. Zudem wurde TNF- α isoliert untersucht. Eine mögliche Erklärung für die Divergenz ist eine geringere Anzahl an Patienten in der gesunden Kontrollgruppe von Omidvari et al. (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe in vorliegender Arbeit (nAUD=31), was eine statistische Verzerrung der Ergebnisse zwangsläufig impliziert. *Chronischer* Alkoholkonsum kann die TNF- α Konzentration aus der BALF der humanen Lunge nach Pathogenkontakt signifikant verringern. Angesichts der bisher vergleichsweise gut ermittelten Evidenz, dass TNF- α eine Schlüsselrolle in der pulmonalen Immunabwehr einnimmt, könnte die gezeigte Downregulation von TNF- α in der menschlichen Lunge nach LPS-Kontakt ein zentraler Faktor bei dem, bereits in vielen klinischen Studien nachgewiesenem, Immundefekt in der Lunge von *chronischen* Alkoholikern sein.

5.2.4 IL-8

Als potentes Chemokin und Aktivator von neutrophilen Granulozyten wird IL-8 auch zu den proinflammatorischen Zytokinen (Th1) gezählt. Mit dieser Arbeit konnten unstimuliert und nach 4 Stunden LPS Stimulation keine Unterschiede zwischen der AUD- und nAUD-Gruppe bezüglich der IL-8-Level gemessen werden. Nach 24h LPS-Stimulation zeigte sich IL-8 in der Lunge der Alkoholgruppe signifikant erniedrigt. Boe et al. zeigten in einem Rattenmodell mit Pneumonie, dass *akuter* Alkoholeinfluss ein dem menschlichen IL-8 ähnliches Chemokin (CINC) vermindert. In der Literatur findet sich der Konsensus, dass Chemokinkonzentrationen bei den mit *akuten* Alkohol gefütterten Ratten aus der BAL-Flüssigkeit verringert sind, gefolgt von verringerter Neutrophilenrekrutierung, erhöhter Bakterienlast und erhöhter Mortalität [2, 4, 84]. Den Daten der Studie von Boe et al. zufolge ist zumindest *akuter* Alkoholeinfluss in der Lage das Chemokin IL-8 in der Lunge zu reduzieren. Neben der gestörten IL-8 Antwort führt Alkoholkonsum wohl auch zu einer Hypo-Ansprechbarkeit der Neutrophilen auf chemotaktische Signale, wie IL-8. Neutrophile sind demnach weniger in der Lage, Bakterien im Menschen und im Tiermodell zu eliminieren, da *chronischer* Alkoholeinfluss neben der IL-8 Produktion wohl auch die Phagozytose und Superoxid-Generierung hemmt [2, 20]. Interessanterweise

zeigen bei lokalen Entzündungsreaktionen in der Lunge, wie beispielsweise einer Pneumonie, sich erhöhte IL-8 Spiegel in dem erkrankten Gewebe im Vergleich zum Gesunden. Boutten et al. zeigten 1999 in einer Untersuchung an Patienten mit ambulant erworbener unilateraler Pneumonie (n=17), dass die Durchschnittskonzentration von IL-8 aus der BAL signifikant erhöht war im Vergleich zur gesunden Lungenseite und zur gesunden Kontrollgruppe. Die systemische IL-8 Konzentration aus dem Patientenserum hingegen war nicht erhöht [118]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Maus et al. an 10 Patienten aus der BAL mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie gegenüber 12 Gesunden [50]. Möglicherweise ist das Lungengewebe von AUD-Patienten weniger in der Lage aufgrund IL-8 Mangels Pathogene zu eliminieren, was die gesteigerte Mortalität und Morbidität von AUD-Patienten bezüglich der perioperativ erworbenen Pneumonie erklären könnte.

5.2.5 IL-10

IL-10 übt starke entzündungshemmende Wirkungen *in vivo* und *in vitro*, zum Teil durch direkte Deaktivierung von Neutrophilen und Makrophagen und durch die Downregulation der Expression mehrerer proinflammatorischer Zytokine, einschließlich TNF- α , IFN- γ , IL-12 und mehreren Mitgliedern der Chemokinfamilie, aus [119]. Sander et al. zeigten 2005 für systemisches IL-10 signifikant höhere Werte bei *chronischen* Alkoholpatienten (n=10) nach koronarer Bypass-Operation und im Vorfeld von sich anschließenden Infektionen gegenüber Nichtalkoholikern (n=34) [41]. Langfristige Alkoholiker zeigten eine Vervierfachung der postoperativen Infektionsrate und eine verlängerte Notwendigkeit der Intensivstationsbehandlung mit Beatmung. Postoperative systemische Level von Interleukin-10 waren signifikant bei *chronisch* alkoholkranken Patienten im Vergleich zu alkoholfreien Patienten erhöht. Diese Beobachtungen waren im Einklang mit der Hypothese, dass postoperativ erhöhtes Interleukin-10 prädiktiv für postoperative, infektiöse Komplikationen ist. Sander et al. schlussfolgerten daraus die dringende Notwendigkeit für interventionelle Ansätze bei *chronischen* Alkoholikern, um eine Modulation der perioperativen Immunantwort bei Hochrisiko-Patienten zu erreichen, welche der postoperativen Immunsuppression durch u.a. erhöhte IL-10 Werte entgegenwirken kann. Weitere experimentelle Daten vermitteln den Eindruck, dass *akuter* Alkoholkonsum IL-10 ebenso erhöht [38, 53]. Szabo et al. konnten an Monozyten

aus dem peripheren Blut eine erhöhte IL-10 Produktion nachweisen. Den Zellen wurde eine physiologisch relevante Menge an Ethanol zugesetzt und u.a. mittels LPS stimuliert [120]. Spies et al. zeigten in einem Tiermodell, dass *subchronischer* Alkoholeinfluss über 8 Tage die Immunantwort auf eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion verändert [12]. Mittels ELISA detektierte IL-10 Level waren 24h nach Infektion in der Mauslunge signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Histologisch konnte zudem ein größerer Lungenschaden in der alkoholischen Mauslunge nach Infektion nachgewiesen werden. Umgekehrt zeigen andere Labormodelle, dass die passive Immunisierung mit anti-IL-10-Antikörpern in Mäusen mit *Klebsiella pneumoniae* in einem verbesserten Überleben und einer verbesserten bakteriellen Clearance im Vergleich zu Kontrolltieren resultierten [119]. Zisman et al. zeigten an Mäusen, die 14 Tage mit Alkohol gefüttert wurden, dass sowohl 48 als auch 72h nach Inokulation vom *K. pneumoniae* die IL-10 Zytokinlevel in der BALF 1,5 bzw. 1,7 fach erhöht waren [119]. Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass *chronischer* Alkoholkonsum die lokale IL-10 Produktion in der Lunge verändern kann, zugunsten der Antiinflammation. *Chronischer* Alkoholkonsum erhöhte die Zytokinkonzentration von IL-10 basal und nach LPS Stimulation in der Lunge des Menschen und somit die antiinflammatorische Wirtantwort auf gramnegativer Bakterien. Analog dazu zeigten sich in dieser Arbeit Hinweise darauf, dass TNF- α möglicherweise sowohl direkt durch Alkohol als auch durch die Aktivierung von IL-10 in seiner Produktion gehemmt werden kann.

5.2.6 IL-12p70

Die Synthese von IL-12 in der Lunge kann direkt von IL-10 gehemmt werden [119]. Zudem ist eine der Schlüsselfunktionen von IL-12 die Induktion der Expression von IFN- γ , einem wichtigen Zytokin für die Abwehr von Erregern wie *Klebsiella pneumoniae* [90, 119]. Die Induktion von IL-12 in humanen Monozyten ist grundlegend bedeutsam für eine inflammatorische Reaktion und für die Initiierung einer Th1 Immunantwort [91]. Szabo et al. zeigten, dass *akuter* Alkoholeinfluss *in vitro* allein keinen Induktionseffekt auf IL-12 durch mononukleare Zellen und Monozyten hat. Stimuliert mittels IFN- γ und / oder Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) zeigte die *akute* Alkoholingestion der Zellen jedoch quasi nach Stimulation über Nacht (24h) einen signifikanten Anstieg der IL-12 Produktion durch mononukleare Zellpopulation sowie, wenn auch deutlich geringer, der isolierten

Monozyten [91]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sprechen für eine initiale Hochregulation in der unstimulierten BALF von IL-12 und IL-10 aus der Lunge des *chronischen* Alkoholikers gegenüber der gesunden Gruppe. Nach 4h LPS Stimulation aber bewegen sich die Konzentrationswerte beider Zytokine diametral. Während bei IL-12 keine Unterschiede zur Kontrollgruppe nach 4 Stunden festgestellt werden konnten, war IL-10 weiter signifikant höher in der AUD Gruppe. Es gilt als hinlänglich bekannt, dass IL-10 ein potenter Inhibitor von IL-12 ist [91] und zeigt sich im Einklang mit unseren Daten. Mandrekar et al. fanden unter *akutem* Alkoholeinfluss auf dendritischen Zellen ebenso eine IL-10 Augmentation, während IL-12 sogar signifikant reduziert wurde [2]. *Chronischer* Alkoholmissbrauch kann in der menschlichen Lunge die IL-12 und IL-10 Balance in Richtung Th2 (Th2 Shift) verändern. Nach 24h LPS Stimulation zeigte sich ähnlich der 4 Stunden LPS Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der IL-12 Produktion bezüglich der Nichttrinkergruppe.

5.3 Effekte von Nikotin auf Immunparameter

5.3.1 HLA-DR, TLR 2, TLR 4 und Zigarettenrauch

In der BALF der Raucher (Gruppe B) gegenüber den Nichtrauchern (Gruppe A) in der nAUD-Gruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung von TLR-2 und -4 bei den rauchenden Nichtalkoholikern. Es demonstriert, dass allein die Inhalation von Tabakrauch in der Lunge die TLR-2 und -4 Präsentation auf den AM zu verändern mag. Das gleiche trifft für HLA-DR zu. Hier zeigt sich ein spiegelverkehrtes Bild. Der Tabakrauch allein scheint bei den nicht *chronischen* Alkoholkonsumenten (Gruppe B) die HLA-DR Expression auf der Zelloberfläche der AM im Vergleich zu den nichtrauchenden Patienten (Gruppe A) erniedrigen zu können. Auch Pankow et al. zeigten in zwei älteren Arbeiten, dass Zigarettenrauch die HLA-DR-Antigen-Dichte auf AM reduzieren kann [63, 64]. Alveolarmakrophagen von Rauchern waren gemäß deren Daten signifikant größer ($p < 0,001$) und präsentierten weniger HLA-DR Antigene ($p < 0,001$) verglichen mit AM von Nichtrauchern. Die HLA-DR-Antigen Dichte auf AM von Rauchern war zudem unabhängig von der Größe der Zellen und Autofluoreszenz. Pankow et al. schlussfolgerten daraufhin, dass Tabakrauch die HLA-DR-Antigen-Expression der AM reduziert und dass diese defekte Expression von HLA-Klasse-II-Antigenen nicht abhängig von der Menge der phagozytierten autofluoreszierenden Tabakteilchen ist [64].

Die Annahme, dass HLA-DR, TLR-2 und -4 allein durch Zigarettenrauch modulierbar sind, wird zudem durch die Beobachtung dieser Arbeit gestützt, dass zwischen den nichtrauchenden Alkoholikern (Gruppe C) und den nichtrauchenden Nichtalkoholikern (Gruppe A) keine Signifikanzen ermittelbar waren. Die Ergebnisse spiegeln zugleich aber auch das Dilemma der Patientenstudie wieder. Da sowohl Zigarettenrauch als auch Alkoholkonsum nachgewiesener Maßen einen Einfluss auf die pulmonale Abwehrfunktion, sprich die AM, haben, diese aber bei *chronischen* Alkoholkonsumenten fast nicht isoliert vorkommen, ist eine genaue Verifizierung der alleinigen Wirkung von Alkohol auf die Lunge ohne Tabakrauch an einer großen Gruppe nahezu unmöglich und die ermittelten Ergebnisse demnach statistisch nur bedingt aussagekräftig. Zudem lässt das Messen der Rezeptordichte von TLR-2 und -4 auf den AM keinen Rückschluss auf mögliche Effekte bezüglich der angeschlossenen Signalkaskaden in der Zelle zu.

In einer weiteren Studie wurde die Phagozytoseleistung der AM von 12 aktuellen Rauchern und 16 Ex-Rauchern mit COPD, 14 gesunden Rauchern und 10 gesunden Nichtrauchern als Kontrolle untersucht. Die Phagozytosefähigkeit der AM war signifikant zurückgegangen in beiden COPD Gruppen und bei gesunden Rauchern im Vergleich zu den gesunden Nichtrauchern. Zudem war die Phagozytosekapazität besser in den COPD-lern, die das Rauchen aufgehört hatten, verglichen mit denen die noch rauchten. AM von aktuellen Rauchern mit COPD und gesunden Rauchern wiesen reduzierte Oberflächenantigene CD31, CD91, CD44, CD71 im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern und Kontrollpersonen auf. Die Daten zeigten zudem, dass eine raucherbezogene Reduzierung der AM Phagozytosefähigkeit und die Expression von mehreren wichtigen Erkennungsmolekülen zumindest teilweise normalisiert werden kann bei Patienten mit COPD, welche das Rauchen aufgehört haben [96].

5.3.2 Zytokine und Zigarettenrauch

Bezüglich der Wirkung von Alkohol ohne den Confounder Zigarettenrauch zeigten sich ähnliche Ergebnisse im Vergleich der beiden großen Gruppen AUD und nAUD unter *chronischem* Alkoholeinfluss. Basal waren in der BALF IL-1 β , IL-6 und statt IL-10 IL-8 signifikant erhöht. Nach der 4 Stunden LPS Stimulation war IL-10 als einziges Zytokin signifikant verändert - nämlich erhöht. TNF- α war in der Gruppe C tendenziell erniedrigt, wengleich nicht signifikant. Nach den 24h LPS-Stimulationen konnten bei den Zytokinen

keine weiteren signifikanten Unterschiede gefunden werden. Zwischen den Rauchern Gruppe B und D konnten ebenfalls keine Unterschiede gemessen werden. Auch zwischen den Rauchern Gruppe A und den Nichtrauchern Gruppe B bestanden keine signifikanten Unterschiede der Zytokinlevel. Hingegen zeigten Gaschler et al. in einem Rattenmodell 2008, dass *chronische* Rauchinhalation über 4 Wochen nach u.a. LPS-Stimulation von AM aus der BAL zu abgeschwächten Zytokinlevel von TNF- α und IL-6 führten, während die TLR-3 und TLR-4 Expression unverändert blieb. Die Zytokinproduktion war reversibel nach Beendigung der Rauchexposition [97].

5.4 Limitationen der Studie

5.4.1 Patientenkollektiv

Martin et al. konnten 2002 zeigen, dass durch die klinische Routine allein nur 16% der Risikotrinker während der ersten Visite und 34% nach insgesamt drei Visiten ermittelt werden. Wenn der CAGE-Fragebogen hinzugezogen wird, erhöhte dies die Sensibilität auf 64%. Die weitere Bestimmung von γ -GT oder CDT im Präscreening führte zu 80 bzw. 85% der richtig Positiven. Eine Kombination aus allen Tests hatte eine Gesamtsensitivität von immerhin 91% zufolge [33]. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass unter allen eingeschlossenen Patienten nicht alle *chronischen* Alkoholkonsumenten korrekt erkannt wurden. Dies gilt insbesondere in Fällen, in denen Individuen gezwungen waren, die Menge des Trinkverhaltens zu leugnen oder zu minimieren, um persönliche, berufliche oder rechtliche Konsequenzen von Alkoholmissbrauch einzudämmen [72]. Auch existieren bis heute keine absolut verlässlichen Biomarker zur Identifizierung von *chronischem* Alkoholkonsum, so dass diese immer nur in Zusammenschau mit der klinischen Anamnese eine Verdachtsdiagnose ergeben [72].

Des Weiteren ist die Anzahl eingeschlossener Patienten in den Gruppen mit *chronischem* Alkoholkonsum ($n_{\text{AUD}}=15$) und ohne Alkoholkonsum ($n_{\text{nAUD}}=31$) in vorliegender Arbeit nicht homogen. Dies ist mehreren schlicht praktischen Umständen dieser klinischen Studie geschuldet. Zum einen gestaltete sich die Rekrutierung der Alkoholgruppe über die Studiendauer von fast 2 Jahren schwierig, da häufiger Ablehnung und Unverständnis der betroffenen Patienten gegenüber dem Studienarzt auftraten als in der Kontrollgruppe. Außerdem war die Verteilung der Patienten auf Station mit *chronischem* Alkoholkonsum

zu den Nichttrinkern per se nicht ausgeglichen, sondern Patienten ohne alkoholbezogenen Risikoabusus dominierten deutlich – und waren wie bereits erwähnt einwilligungsfreudiger.

Auch die Geschlechterverteilung in beiden Gruppen war inhomogen. In beiden Gruppen dominierten die Männer, in der Alkoholgruppe konnte nur eine Frau eingeschlossen werden gegenüber 11 Frauen in der Nichttrinkergruppe. Frauen haben mehreren Studien zufolge in den reproduktiven Jahren eine erhöhte Immunantwort als Männer [121]. Östrogen ist dabei ein Immunstimulanz, während Testosteron das Immunsystem supprimiert. Östrogen ist in der Lage, die Zytokinproduktion zu beeinflussen [121]. Insofern könnte die inhomogene Geschlechterverteilung das Ergebnis der gemessenen Zytokinkonzentrationen in den jeweiligen Gruppen verzerrt haben.

5.4.2 Methodikdiskussion

5.4.2.1 Bronchoalveoläre Lavage

Seit über 40 Jahren nutzen Forscher der ganzen Welt die BAL, um das Wissen über die pulmonale Medizin zu erweitern [49]. Die Bronchoskopie gilt als sehr sicheres Verfahren mit einer Komplikationsrate von 2,06% [49]. Hypoxämie und Fieber sind dabei die häufigsten und selbstlimitierenden Formen. Trotzdem ist die BAL im Vergleich zu anderen endoskopischen Verfahren eher unsicher im Vergleich zu den Komplikationsraten der Koloskopie von 0,2% oder der Gastroskopie von 0,1%. Die BAL ist nicht risikofrei und es willigten nicht alle Patienten bei der Anfrage zur Teilnahme an der Studie ein, was zwangsläufig zur statistischen Verzerrung führt. Außerdem ist das Verfahren der BAL unter den verschiedenen Forschungseinrichtungen nicht rigoros standardisiert, was eine Vergleichbarkeit erschweren kann [49]. Die BAL wurde in unserem Setting immer vom gleichen Studienarzt und mit demselben Bronchoskop durchgeführt.

5.4.2.2 Durchflusszytometrie

Es hat sich gezeigt, dass die Messungen mittels Durchflusszytometrie bei AM erschwert werden können, bedingt durch ihre erhöhte Autofluoreszenz [95]. Wenn man zudem berücksichtigt, dass exogene Einflüsse wie Tabakpartikel durch

Zigarettenrauchinhalation die Autofluoreszenz von AM enorm erhöhen können, wird deutlich, dass die Berücksichtigung der Autofluoreszenz eine ernste Herausforderung für die Durchflusszytometrie der Zellpopulationen in der Lunge darstellt [122]. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass Messungen dieser Studie, speziell der AM von Rauchern, durch erhöhte Autofluoreszenz verzerrt worden sind.

5.4.2.3 Interpretation von Zytokinen und deren Adhäsionsmolekülen

Weil sich die physiologische Antwort im Verhältnis zu der Schwere der Krankheit und ihrem Verlauf, z.B. vom systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) hin zum Multiorganversagen, erhöht, wurde davon ausgegangen, dass sich diese Reaktionen parallel auf eine Erhöhung der Intensität von Zytokinlevel auswirken. Als logische Folge wurden zirkulierende Zytokinkonzentrationen allgemein als "Fingerabdrücke" dieser Entwicklung wahrgenommen [115]. Bei der Beurteilung von Zytokinkonzentrationswerten sollten jedoch wichtige Dinge berücksichtigt werden. Spiegel zirkulierender Zytokine und Adhäsionsmoleküle geben nur ein mittelbares Bild der tatsächlichen Expression im Gewebe und der dadurch hervorgerufenen biologischen Reaktionen wieder. Cavaillon et al. sprechen hierbei von der möglichen Spitze des Eisberges [123]. Einerseits stellen gemessene systemische Spiegel nicht die Gesamtheit der Produktion des Organismus dar. Andererseits gibt es mehrere Faktoren, die ihre Indikatorfunktion für die Gesamtsynthese und eine unmittelbare Assoziation zwischen gemessenen zirkulierenden Spiegeln und ihrer vermuteten biologischen Bedeutung in Frage stellen [115]. Analog dazu ist zumindest die Interpretation der basal gemessenen Zytokinspiegel aus der Lunge in der unstimulierten BALF mit Vorsicht zu genießen.

Es besteht eine komplexe Balance zwischen der Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen und mehreren nachgeschalteten Ereignissen, die die Menge gemessener, systemischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle beeinflussen. Entscheidend bei der Beurteilung von Zytokinkonzentrationen ist neben der Expression von Zytokinen, die Sekretion derer, als auch die Anzahl an löslichen und membrangebundenen Rezeptoren und in der logischen Konsequenz die Anzahl an gebundener Zytokin-Rezeptor-Komplexen [53]. Neben der Bindung von freien Zytokin-Komplexen an die Membranen ihrer Ursprungszelle, der Kinetik in den intravasalen Raum, der Bindung von freien Zytokinen an die Zielzelle, dem Ausmaß und der Kinetik der zirkulierenden

löslichen fernen Rezeptoren und natürlichen Zytokin-Antagonisten hat auch die natürliche Katabolismusrate einen Einfluss auf gemessene Zytokinspiegel. Ferner kann bei der Bestimmung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen ein bedeutender Anteil der ursprünglich freigesetzten immunmodulatorischen Parameter durch parakrine Bindung an Zellrezeptoren der Messung entgehen [115]. Die Ausschüttung des Zytokinrezeptors durch die Zelle kann auf zwei Weisen den Einfluss des Zytokins auf die Zelle vermindern. Zum einen spricht die rezeptorlose Zelle möglicherweise nicht mehr auf das Zytokin an, zum anderen können die ausgeschütteten, zirkulierenden Rezeptoren mit membrangebundenen Rezeptoren um das entsprechende zirkulierende Zytokin konkurrieren. Jedoch könnten zirkulierende Rezeptoren auch zu einer Erhöhung der Zytokinaktivität führen, indem sie das Zytokin während des Transports vor Proteolyse schützen und so ein Reservoir von aktivem oder potentiell aktivem Zytokin bilden. Derzeit gebräuchliche Assays können vermutlich nicht zwischen freien und gebundenen immunmodulatorischen Parametern unterscheiden oder intakten Molekülen und Fragmenten mit erhaltener epitopischer Antigenität [20, 115]. Die Detektion löslicher Adhäsionsmoleküle muss daher nicht bedeuten, dass diese auch monomerisch vorliegen. Die reversible Bindung von löslichen Zytokinen an Zell-gebundene Rezeptoren und Currie-Proteine kann Zytokine vor der Erkennung abschirmen, während ihre biologische Aktivitätspotenz erhalten bleibt [115]. Diesbezüglich ist unklar, ob die in vielen Studien angewandten ELISA-Bestimmungskits zwischen biologisch aktivem und inaktivem Material unterscheiden können. Mittels dem BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit sollen auch Rezeptor-Komplexe detektiert werden können, womit eine mögliche Fehlerquelle bei der Einschätzung der biologischen Aktivität von Zytokinen beseitigt wird. Affinität und Dissoziationskonstanten der Zytokine und Adhäsionsmoleküle für ligandentragende Zellen sind weitere wenig bekannte Faktoren, die eine Einschätzung ihrer biologischen Bedeutung einschränken. Bei Leber- und Nierenerkrankungen ist es von praktischer Bedeutung erhöhte Spiegel immunmodulatorischer Parameter mit erhöhter Freisetzung zu korrelieren, um auszuschließen, dass erhöhte Spiegel lediglich eine Folge verminderter Elimination sind. Die Zytokinsekretion ist immer in Verbindung mit der Clearance, also erhöhte Sekretion in Bezug auf veränderte Clearance, zu beurteilen [76]. Ein generelles methodisches Problem ergibt sich bei der Betrachtung von Absolutwerten und bei Vergleichen zwischen verschiedenen Studien über zirkulierende Adhäsionsmoleküle und Zytokine, da die Bestimmungskits zu wenig standardisiert sind und aufgrund von Unterschieden der

Antikörperspezifität und der verwendeten Standards bei der Messung derselben Zytokine zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen [124]. Hervorzuheben in der vorliegenden Arbeit ist die gleichzeitige Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, wie sie von Matuschak gefordert wurde [115].

Trotz aller methodischer Vorbehalte ist festzuhalten, dass in zahlreichen Studien die Konzentration von Zytokinen und / oder Adhäsionsmolekülen gut mit klinischen Zustandsbildern und Verläufen korrelierten.

Gegenüber gängigen Tiermodellen hat diese klinisch experimentelle Studie noch einen entscheidenden Vorteil. Mit keinem Tiermodell ist das *chronische*, gesundheitsgefährdende Trinkverhalten nachzuahmen oder wird diesem gerecht. Die Komplexität der menschlichen Anatomie und Biochemie, gepaart mit der Existenz von vielen anderen Variablen in Verbindung mit Alkoholmissbrauch beim Menschen, macht es extrem schwierig, alle Facetten des menschlichen Trinkens zu replizieren. In Mausmodellen mit z.B. der Lieber DeCarli Flüssigdiät sind die Tiere gezwungen Alkohol zu konsumieren, jedes Mal wenn sie Hunger auf feste Nahrung oder Durst auf Wasser haben. Der Wechsel von dem freien Zugang zu regelmäßig fester Nahrung und Trinkwasser hin zu einer rein flüssigen alkoholischen Diät mit hohem Fettanteil als alleinige Quelle für Nahrung und Wasser kann Änderungen, unabhängig von Alkohol, in den untersuchten Parametern verursachen [98]. Zum Beispiel zeigten elektronenmikroskopische Auswertungen der Lungenfunktion von Mäusen nach der Lieber-DeCarli Diät für längere oder kürzere Zeiträume Lipidakkumulationen in der Lunge. Die Intensität stieg dabei mit der Dauer der Fütterung [98].

5.5 Schlussfolgerung

Chronischer Alkoholabusus führt zu veränderten Entzündungsreaktionen der Zellen und Antworten des angeborenen Immunsystems mit assoziierten Krankheiten und einer erhöhten Inzidenz von pulmonalen Infektionen. Dies hat weltweit den Fokus der Forscher auf Zytokine gelegt, um u.a. neue Therapieansätze bei pulmonalen Infektionen oder geeignete Biomarker für Alkoholabhängigkeit und Sepsis zu identifizieren [72]. Bisher akkumulierte Daten zur Funktion der AM bei *chronischen* Alkoholikern stammen zum größten Teil aus reinen *in vitro* Studien oder Tierexperimenten.

Erstmals konnte mit dieser klinisch experimentellen Arbeit gezeigt werden, dass das humane Zytokinnetzwerk bestehend aus pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der Lunge durch langfristigen, gesundheitsgefährdenden Alkoholkonsum in verschiedener Weise beeinträchtigt wird. *Ex vivo* charakterisierte Zytokinspiegel von Panendoskopiepatienten mit gesundheitsgefährdetem Trinkverhalten aus der BALF zeigten unstimuliert signifikante Erhöhungen von pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-10, IL-12p70). Im Verlauf war *ex vivo* nach 4 stündiger LPS Stimulation IL-10 weiterhin signifikant erhöht, während das proinflammatorische Zytokin TNF- α signifikant in der Alkoholgruppe reduziert war. Nach 24h LPS Stimulation hatten die Zytokinspiegel bis auf IL-8 beider Gruppen kein signifikant unterschiedliches Niveau erreicht.

Tabelle 20: Veränderungen der Zytokinkonzentrationen im Alveolarraum durch chronischen Alkoholkonsum

	AUD (n=15)	nAUD (n=31)	p
IL-10 unstimuliert	72.35 (14.7 / 223.03)	16.79 (0.00 / 39.15)	0.025*
IL-1 β unstimuliert	61.44 (19.65 / 262.84)	20.62 (0.00 / 57.05)	0.041*
IL-12p70	49.47 (28.88 / 187.43)	28.24 (0.00 / 53.59)	0,016*
IL-10 LPS 4h	96.05 (29.20 / 123.31)	33.97 (10.83 / 68.91)	0.039*
TNF- α LPS 4h	2,034.55 (160.28 / 6,588.86)	6,141.11 (3,076.21 / 9,973.63)	0.05*
IL-8 LPS 24h	44,805.52 (7,909.95 / 178,510.18)	112,769.30 (38,882.32 / 345,782.13)	0.05*

n=Patientenzahl; Zytokinkonzentrationen in pg/10⁶AM angegeben als Median (25.Perzentile/75.Perzentile); Mann-Whitney-U-Test, p=Signifikanz zwischen den Gruppen

Die Funktion der Alveolarmakrophagen könnte auf eine insgesamt erhöhte inflammatorische Reizantwort durch *chronischen*, ethyltoxischen Einfluss gedrängt worden sein. Im Verlauf nach 4 Stunden LPS Kontakt produzierten die humanen AM weiterhin signifikant erhöhte Level von antientzündlichem Zytokin IL-10 während simultan die Proinflammation mittels TNF- α und nach 24h mittels IL-8 herunter reguliert wurde.

Möglicherweise kann dies zum Teil die erhöhte Ausgangsbereitschaft zu pulmonalen Infektionen in der Lunge von *chronischen* AUD-Patienten erklären, sowie die im Verlauf einer pulmonalen Infektion erhöhte Mortalität und protrahierte Rekonvaleszenz.

Keinen signifikanten Einfluss scheint *chronischer* Alkoholkonsum auf die HLA-DR Expression der AM zu haben. Dagegen scheint Zigarettenrauch allein HLA-DR gegenüber der Kontrollgruppe vermindern zu können. Ebenso konnten keine TLR-2 und -4 relevanten Veränderungen bezüglich der Präsentation auf den AM der *chronischen* AUD-Patienten gemessen werden. Wiederum konnte jedoch die Inhalation von Zigarettenrauch allein ohne *chronischen* Alkoholkonsum auf Dauer die TLR-2 und -4 Präsentation auf den AM signifikant erhöhen. Angesichts der Ergebnisse erscheint es sinnvoll weitere prospektive klinische Untersuchungen an größeren Kollektiven anzustreben, um ein statistisch wertvolleres Abbild der Unterschiede der einzelnen Zytokine in der Lunge von *chronischen* Alkoholkonsumenten zu erhalten. Die bisher zumeist rein (tier-)experimentell ermittelte Evidenz bezüglich des *chronischen* Alkoholkonsums auf die pulmonale Immunabwehr zeigt sich zumindest in einem Punkt durch diese Arbeit bestätigt. *Chronischer* Alkoholkonsum verändert das Zytokingleichgewicht in der Lunge und führt in der Folge auch zu veränderten Zytokinpiegeln nach Pathogen-Kontakt. Die Interpretation der einzelnen Parameter als auch der Einfluss von weiteren Faktoren wie Zigarettenrauch gilt es weiter zu untersuchen. Auch gilt es sowohl experimentell als auch klinisch experimentell geeignete Laborstandards zu schaffen, da bisherige Ergebnisse sich stark, in Abhängigkeit der jeweiligen Labormodelle, voneinander unterscheiden. Denkbar wären in der Zukunft daraus allgemeingültig ableitbare Modelle zum Zytokinprofil in der Lunge des *chronischen* Alkoholtrinkers gegenüber dem Nichttrinker. Diese könnten dann Angriffspunkte für z.B. prophylaktische Maßnahmen regulativer Art in das geschädigte Zytokinnetzwerk der menschlichen Alkoholikerlunge darstellen, um alkoholassoziierte Infektionen, erhöhte perioperative Mortalität und Morbidität zu mildern oder gar zu verhindern. Die grundsätzliche Etablierung von Biomarkern mittels BAL aus der Lunge als Screeningmethode scheint bei dem bisherigen Stand der Technik nicht sinnvoll, da dies einerseits viel zu teuer und sehr aufwändig ist und andererseits die erhöhten Risiken durch den Eingriff dem bisherigen nicht direkt ableitbaren Patientennutzen überwiegen.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Tobias Thiel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von chronischem Alkoholkonsum auf die Funktion der Alveolarmakrophagen bei Panendoskopiepatienten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Literaturverzeichnis:

1. Joshi, P.C. and D.M. Guidot, *The alcoholic lung: epidemiology, pathophysiology, and potential therapies*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(4): p. L813-23.
2. Szabo, G. and P. Mandrekar, *A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(2): p. 220-32.
3. Sellman, D., *Ten things the alcohol industry won't tell you about alcohol*. Drug Alcohol Rev, 2010. **29**(3): p. 301-3.
4. Szabo, G., *Consequences of alcohol consumption on host defence*. Alcohol Alcohol, 1999. **34**(6): p. 830-41.
5. Szabo, G., *Alcohol's contribution to compromised immunity*. Alcohol Health Res World, 1997. **21**(1): p. 30-41.
6. Spinuzzi, F., R. Gerli and P. Rambotti, *Alcohol and immune defense*. JAMA, 1987. **257**(3): p. 316-7.
7. Moss, M. and E.L. Burnham, *Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction*. Crit Care Med, 2003. **31**(4 Suppl): p. S207-12.
8. Joshi, P.C., L. Applewhite, J.D. Ritzenthaler, J. Roman, A.L. Fernandez, D.C. Eaton, L.A. Brown and D.M. Guidot, *Chronic ethanol ingestion in rats decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression and downstream signaling in the alveolar macrophage*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6837-45.
9. Happel, K.I. and S. Nelson, *Alcohol, immunosuppression, and the lung*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(5): p. 428-32.
10. Cook, R.T., *Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(9): p. 1927-42.
11. Brown, L.A., R.T. Cook, T.R. Jerrells, J.K. Kolls, L.E. Nagy, G. Szabo, J.R. Wands and E.J. Kovacs, *Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity*. Alcohol Clin Exp Res, 2006. **30**(9): p. 1624-31.
12. Spies, C.D., N. Lanzke, U. Schlichting, S. Muehlbauer, C. Pipolo, M. von Mettenheim, A. Lehmann, L. Morawietz, H. Nattermann and M. Sander, *Effects of ethanol on cytokine production after surgery in a murine model of gram-negative pneumonia*. Alcohol Clin Exp Res, 2008. **32**(2): p. 331-8.
13. Tonnesen, H., *Alcohol abuse and postoperative morbidity*. Dan Med Bull, 2003. **50**(2): p. 139-60.
14. Spies, C.D., M. Sander, K. Stangl, J. Fernandez-Sola, V.R. Preedy, E. Rubin, S. Andreasson, E.Z. Hanna and W.J. Kox, *Effects of alcohol on the heart*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(5): p. 337-43.
15. Siu, S.T., N. Udaltsova, C. Iribarren and A.L. Klatsky, *Alcohol and lung airways function*. Perm J, 2010. **14**(1): p. 11-8.
16. Ringborg, U., *Alcohol and risk of cancer*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(7 Suppl): p. 323S-328S.
17. Poschl, G., F. Stickel, X.D. Wang and H.K. Seitz, *Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(1): p. 65-71.
18. Poschl, G. and H.K. Seitz, *Alcohol and cancer*. Alcohol Alcohol, 2004. **39**(3): p. 155-65.

19. Bagnardi, V., G. Randi, J. Lubin, D. Consonni, T.K. Lam, A.F. Subar, A.M. Goldstein, S. Wacholder, A.W. Bergen, M.A. Tucker, A. Decarli, N.E. Caporaso, P.A. Bertazzi and M.T. Landi, *Alcohol consumption and lung cancer risk in the Environment and Genetics in Lung Cancer Etiology (EAGLE) study*. Am J Epidemiol, 2010. **171**(1): p. 36-44.
20. MacGregor, R.R., *Alcohol and immune defense*. JAMA, 1986. **256**(11): p. 1474-9.
21. Seth, D., N.B. D'Souza El-Guindy, M. Apte, M. Mari, S. Dooley, M. Neuman, P.S. Haber, G.C. Kundu, A. Darwanto, W.J. de Villiers, A. Vonlaufen, Z. Xu, P. Phillips, S. Yang, D. Goldstein, R.M. Pirola, J.S. Wilson, A. Moles, A. Fernandez, A. Colell, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa, C. Meyer and N.M. Meindl-Beinker, *Alcohol, signaling, and ECM turnover*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **34**(1): p. 4-18.
22. Spies, C., H. Tonnesen, S. Andreasson, A. Helander and K. Conigrave, *Perioperative morbidity and mortality in chronic alcoholic patients*. Alcohol Clin Exp Res, 2001. **25**(5 Suppl ISBRA): p. 164S-170S.
23. Moss, M. and E.L. Burnham, *Alcohol abuse in the critically ill patient*. Lancet, 2006. **368**(9554): p. 2231-42.
24. Sisson, J.H., T.A. Wyatt, D.M. Guidot, G.J. Bagby, A. Helander, H. Tønnesen and C.D. Spies, *Bench to Bedside: Mechanisms and Consequences of Alcohol-Altered Host Defenses*. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2005. **29**(6): p. 1090-1097.
25. Lau, A., V. von Dossow, M. Sander, M. MacGuill, N. Lanzke and C. Spies, *Alcohol use disorder and perioperative immune dysfunction*. Anesth Analg, 2009. **108**(3): p. 916-20.
26. Zhang, P., G.J. Bagby, K.I. Happel, C.E. Raasch and S. Nelson, *Alcohol abuse, immunosuppression, and pulmonary infection*. Curr Drug Abuse Rev, 2008. **1**(1): p. 56-67.
27. Gaertner, B.e.a. *Alkohol - Zahlen und Fakten zum Konsum*. In: *Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.)*. 2013 [cited 2013 April 27]; Jahrbuch Sucht 2013:[Daten und Fakten]. Available from: <http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
28. Karkoulias, K., H. Tsitsaras, D. Patouchas, F. Sampsonas, D. Likouras, A. Kaparianos and K. Spiropoulos, *The alcoholic lung disease: historical background and clinical features*. Medicina (Kaunas), 2008. **44**(9): p. 651-64.
29. Gärtner, B. *Alkoholverbrauch je Einwohner an reinem Alkohol*. 2010 [cited 2011 April 27]; Daten und Fakten]. Available from: <http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
30. Sander, M., T. Neumann, V. von Dossow, H. Schonfeld, A. Lau, V. Eggers and C. Spies, *[Alcohol use disorder: risks in anesthesia and intensive care medicine]*. Internist (Berl), 2006. **47**(4): p. 332, 334-6, 338, passim.
31. Lehmann, F. (2007) *Bilanzbericht 2004 - 2006 der BZgA*. 35-35.
32. BMG, B.f.G.-. *Drogen- und Suchtbericht*. 2009, Bundesministerium für Gesundheit (BMG). p. 38-48.
33. Martin, M.J., C. Heymann, T. Neumann, L. Schmidt, F. Soost, B. Mazurek, B. Bohm, C. Marks, K. Helling, E. Lenzenhuber, C. Muller, W.J. Kox and C.D. Spies, *Preoperative evaluation of chronic alcoholics assessed for surgery of the upper digestive tract*. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(6): p. 836-40.
34. Spies, C.D., A. Nordmann, G. Brummer, C. Marks, C. Conrad, G. Berger, N. Runkel, T. Neumann, C. Müller, H. Rommelspacher, M. Specht, L. Hannemann, H.W. Striebel and W. Schaffartzik, *Intensive care unit stay is prolonged in chronic alcoholic men following tumor resection of the upper digestive tract*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1996. **40**(6): p. 649-656.

35. De Wit, M., A.M. Best, C. Gennings, E.L. Burnham and M. Moss, *Alcohol Use Disorders Increase the Risk for Mechanical Ventilation in Medical Patients*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2007. **31**(7): p. 1224-1230.
36. Messingham, K.A., D.E. Faunce and E.J. Kovacs, *Alcohol, injury, and cellular immunity*. *Alcohol*, 2002. **28**(3): p. 137-49.
37. Greiffenstein, P., K.W. Mathis, C.V. Stouwe and P.E. Molina, *Alcohol binge before trauma/hemorrhage impairs integrity of host defense mechanisms during recovery*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007. **31**(4): p. 704-15.
38. Boe, D.M., R.W. Vandivier, E.L. Burnham and M. Moss, *Alcohol abuse and pulmonary disease*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(5): p. 1097-104.
39. Meyerholz, D.K., M. Edsen-Moore, J. McGill, R.A. Coleman, R.T. Cook and K.L. Legge, *Chronic alcohol consumption increases the severity of murine influenza virus infections*. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 641-8.
40. Nachtigall, I., A. Tamarkin, S. Tafelski, M. Deja, E. Halle, P. Gastmeier, K.D. Wernecke, T. Bauer, M. Kastrup and C. Spies, *Impact of adherence to standard operating procedures for pneumonia on outcome of intensive care unit patients*. *Crit Care Med*, 2009. **37**(1): p. 159-66.
41. Sander, M., C. von Heymann, T. Neumann, J.P. Braun, M. Kastrup, S. Beholz, W. Konertz and C.D. Spies, *Increased interleukin-10 and cortisol in long-term alcoholics after cardiopulmonary bypass: a hint to the increased postoperative infection rate?* *Alcohol Clin Exp Res*, 2005. **29**(9): p. 1677-84.
42. Spies, C., V. Eggers, G. Szabo, A. Lau, V. von Dossow, H. Schoenfeld, H. Althoff, K. Hegenscheid, B. Bohm, T. Schroeder, S. Pfeiffer, S. Ziemer, C. Paschen, M. Klein, C. Marks, P. Miller, M. Sander, K.D. Wernecke, E. Achterberg, U. Kaisers and H.D. Volk, *Intervention at the level of the neuroendocrine-immune axis and postoperative pneumonia rate in long-term alcoholics*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(4): p. 408-14.
43. Brown, L.A., F.L. Harris, X.D. Ping and T.W. Gauthier, *Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability?* *Alcohol*, 2004. **33**(3): p. 191-7.
44. Polikandriotis, J.A., H.L. Rupnow, S.C. Elms, R.E. Clempus, D.J. Campbell, R.L. Sutliff, L.A. Brown, D.M. Guidot and C.M. Hart, *Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **34**(3): p. 314-9.
45. Guth, A.M., W.J. Janssen, C.M. Bosio, E.C. Crouch, P.M. Henson and S.W. Dow, *Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **296**(6): p. L936-46.
46. Chandler, D.B., W.C. Fuller, R.M. Jackson and J.D. Fulmer, *Fractionation of rat alveolar macrophages by isopycnic centrifugation: morphological, cytochemical, biochemical, and functional properties*. *J Leukoc Biol*, 1986. **39**(4): p. 371-83.
47. Gosset, P., B. Wallaert, V. Canva-Delcambre, J.F. Colombel and A.B. Tonnel, *Impaired secretion and mRNA expression of monokines by alveolar macrophages from nonsmoking patients with alcoholic liver cirrhosis*. *J Infect Dis*, 1995. **171**(3): p. 743-6.
48. Strieter, R.M., J.A. Belperio and M.P. Keane, *Host innate defenses in the lung: the role of cytokines*. *Curr Opin Infect Dis*, 2003. **16**(3): p. 193-8.
49. Rose, A.S. and K.S. Knox, *Bronchoalveolar lavage as a research tool*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2007. **28**(5): p. 561-73.

50. Maus, U., S. Rosseau, U. Knies, W. Seeger and J. Lohmeyer, *Expression of pro-inflammatory cytokines by flow-sorted alveolar macrophages in severe pneumonia*. Eur Respir J, 1998. **11**(3): p. 534-41.
51. Dorio, R.J., J.B. Hoek, E. Rubin and H.J. Forman, *Ethanol modulation of rat alveolar macrophage superoxide production*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(18): p. 3528-31.
52. Palecanda, A. and L. Kobzik, *Alveolar macrophage-environmental particle interaction: analysis by flow cytometry*. Methods, 2000. **21**(3): p. 241-7.
53. D'Souza El-Guindy, N.B., W.J. de Villiers and D.E. Doherty, *Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro- and anti-inflammatory mediator balance*. Alcohol, 2007. **41**(5): p. 335-45.
54. Gamble, L., C.M. Mason and S. Nelson, *The effects of alcohol on immunity and bacterial infection in the lung*. Med Mal Infect, 2006. **36**(2): p. 72-7.
55. Kamat, P.P., A. Slutsky, H. Zhang, R.I. Bechara, L.A. Brown, R.C. Garcia, P.C. Joshi, C.D. Kershaw and D.M. Guidot, *Mechanical ventilation exacerbates alveolar macrophage dysfunction in the lungs of ethanol-fed rats*. Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(8): p. 1457-65.
56. Brown, S.D., T.W. Gauthier and L.A. Brown, *Impaired terminal differentiation of pulmonary macrophages in a Guinea pig model of chronic ethanol ingestion*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(10): p. 1782-93.
57. Campbell, D.A., R.M. du Bois, R.G. Butcher and L.W. Poulter, *The density of HLA-DR antigen expression on alveolar macrophages is increased in pulmonary sarcoidosis*. Clin Exp Immunol, 1986. **65**(1): p. 165-71.
58. Cheadle, W.G., *The human leukocyte antigens and their relationship to infection*. Am J Surg, 1993. **165**(2A Suppl): p. 75S-81S.
59. Popp, W. and F.J. Wachtler, *Correlation of morphological patterns of nucleoli in alveolar macrophages with HLA-DR antigen expression in sarcoidosis*. Thorax, 1991. **46**(12): p. 878-80.
60. Popp, W., O. Braun, H. Zwick, H. Rauscher and L. Ritschka, *Increased expression of HLA-DR antigen on alveolar macrophages in pulmonary diseases*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1989. **414**(5): p. 393-7.
61. Lekkou, A., M. Karakantza, A. Mouzaki, F. Kalfarentzos and C.A. Gogos, *Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(1): p. 161-7.
62. Buhling, F., A. Ittenson, D. Kaiser, G. Tholert, B. Hoffmann, D. Reinhold, S. Ansorge and T. Welte, *MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia*. Immunol Lett, 2000. **71**(3): p. 185-90.
63. Pankow, W., K. Neumann, J. Ruschoff, R. Schroder and P. von Wichert, *Reduction in HLA-DR antigen density on alveolar macrophages of smokers*. Lung, 1991. **169**(5): p. 255-62.
64. Pankow, W., K. Neumann, J. Ruschoff and P. von Wichert, *Human alveolar macrophages: comparison of cell size, autofluorescence, and HLA-DR antigen expression in smokers and nonsmokers*. Cancer Detect Prev, 1995. **19**(3): p. 268-73.
65. Oliva, J., F. Bardag-Gorce, J. Li, B.A. French and S.W. French, *S-adenosylmethionine prevents the up regulation of Toll-like receptor (TLR) signaling caused by chronic ethanol feeding in rats*. Exp Mol Pathol, 2011. **90**(3): p. 239-43.
66. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.

67. Oak, S., P. Mandrekar, D. Catalano, K. Kodys and G. Szabo, *TLR2- and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7628-35.
68. Crews, F.T., R. Bechara, L.A. Brown, D.M. Guidot, P. Mandrekar, S. Oak, L. Qin, G. Szabo, M. Wheeler and J. Zou, *Cytokines and alcohol*. Alcohol Clin Exp Res, 2006. **30**(4): p. 720-30.
69. Bailey, K.L., J.H. Sisson, D.J. Romberger, J.E. Robinson and T.A. Wyatt, *Alcohol up-regulates TLR2 through a NO/cGMP dependent pathway*. Alcohol Clin Exp Res, 2010. **34**(1): p. 51-6.
70. Basu, S. and M.J. Fenton, *Toll-like receptors: function and roles in lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(5): p. L887-92.
71. Bird, M.D., A. Zahs, C. Deburghgraeve, L. Ramirez, M.A. Choudhry and E.J. Kovacs, *Decreased pulmonary inflammation following ethanol and burn injury in mice deficient in TLR4 but not TLR2 signaling*. Alcohol Clin Exp Res, 2010. **34**(10): p. 1733-41.
72. Achur, R.N., W.M. Freeman and K.E. Vrana, *Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(1): p. 83-91.
73. Kotani, N., H. Hashimoto, D.I. Sessler, M. Muraoka, J.S. Wang, M.F. O'Connor and A. Matsuki, *Cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary than systemic proinflammatory cytokines*. Anesth Analg, 2000. **90**(5): p. 1039-45.
74. Strieter, R.M., J.A. Belperio and M.P. Keane, *Cytokines in innate host defense in the lung*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 699-705.
75. Laso, F.J., J.M. Vaquero, J. Almeida, M. Marcos and A. Orfao, *Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(5): p. 846-54.
76. Deaciuc, I.V., *Alcohol and cytokine networks*. Alcohol, 1997. **14**(5): p. 421-30.
77. Sander, M., C. von Heymann, V. von Dossow, C. Spaethe, W.F. Konertz, U. Jain and C.D. Spies, *Increased interleukin-6 after cardiac surgery predicts infection*. Anesth Analg, 2006. **102**(6): p. 1623-9.
78. Goral, J., M.A. Choudhry and E.J. Kovacs, *Acute ethanol exposure inhibits macrophage IL-6 production: role of p38 and ERK1/2 MAPK*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 553-9.
79. Barton-Pai, A., C. Feleder and A. Johnson, *Tumor necrosis factor-alpha induces increased lung vascular permeability: A role for GSK3alpha/beta*. Eur J Pharmacol, 2011. **657**(1-3): p. 159-66.
80. Nelson, S., G. Bagby and W.R. Summer, *Alcohol suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor activity in serum and lung*. Life Sci, 1989. **44**(10): p. 673-6.
81. Nelson, S., G.J. Bagby, B.G. Bainton and W.R. Summer, *The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response*. J Infect Dis, 1989. **160**(3): p. 422-9.
82. Standiford, T.J. and J.M. Danforth, *Ethanol feeding inhibits proinflammatory cytokine expression from murine alveolar macrophages ex vivo*. Alcohol Clin Exp Res, 1997. **21**(7): p. 1212-7.
83. Omidvari, K., R. Casey, S. Nelson, R. Olariu and J.E. Shellito, *Alveolar macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in chronic alcoholics without liver disease*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(3): p. 567-72.
84. Arbabi, S., I. Garcia, G.J. Bauer and R.V. Maier, *Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of the p38 pathway*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7441-5.

85. Boe, D.M., T.R. Richens, S.A. Horstmann, E.L. Burnham, W.J. Janssen, P.M. Henson, M. Moss and R.W. Vandivier, *Acute and chronic alcohol exposure impair the phagocytosis of apoptotic cells and enhance the pulmonary inflammatory response*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010. **34**(10): p. 1723-32.
86. Boe, D.M., S. Nelson, P. Zhang, L. Quinton and G.J. Bagby, *Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the host defense response to Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003. **27**(11): p. 1838-45.
87. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
88. Fernandez, S., P. Jose, M.G. Avdiushko, A.M. Kaplan and D.A. Cohen, *Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2613-20.
89. Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman and A. O'Garra, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
90. Happel, K.I., P.J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L.J. Quinton, A.R. Odden, J.E. Shellito, G.J. Bagby, S. Nelson and J.K. Kolls, *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 761-9.
91. Szabo, G., L. Girouard, P. Mandrekar and D. Catalano, *Regulation of monocyte IL-12 production: augmentation by lymphocyte contact and acute ethanol treatment, inhibition by elevated intracellular cAMP*. *Int J Immunopharmacol*, 1998. **20**(9): p. 491-503.
92. Myers, M.G., N.M. Doran and S.A. Brown, *Is cigarette smoking related to alcohol use during the 8 years following treatment for adolescent alcohol and other drug abuse?* *Alcohol Alcohol*, 2007. **42**(3): p. 226-33.
93. Gentry-Nielsen, M.J., E.V. Top, M.U. Snitily, C.A. Casey and L.C. Preheim, *A rat model to determine the biomedical consequences of concurrent ethanol ingestion and cigarette smoke exposure*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004. **28**(7): p. 1120-8.
94. Vander Top, E.A., G.A. Perry, M.U. Snitily and M.J. Gentry-Nielsen, *Smoke exposure and ethanol ingestion modulate intrapulmonary polymorphonuclear leukocyte killing, but not recruitment or phagocytosis*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006. **30**(9): p. 1599-607.
95. Lofdahl, J.M., J. Wahlstrom and C.M. Skold, *Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(3): p. 428-37.
96. Hodge, S., G. Hodge, J. Ahern, H. Jersmann, M. Holmes and P.N. Reynolds, *Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **37**(6): p. 748-55.
97. Gaschler, G.J., C.C. Zavitz, C.M. Bauer, M. Skrtic, M. Lindahl, C.S. Robbins, B. Chen and M.R. Stampfli, *Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **38**(2): p. 218-26.
98. D'Souza El-Guindy, N.B., E.J. Kovacs, P. De Witte, C. Spies, J.M. Littleton, W.J. de Villiers, A.J. Lott, T.P. Plackett, N. Lanzke and G.G. Meadows, *Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010. **34**(9): p. 1489-511.
99. Saunders, J.B., O.G. Aasland, T.F. Babor, J.R. de la Fuente and M. Grant, *Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II*. *Addiction*, 1993. **88**(6): p. 791-804.

100. Reinert, D.F. and J.P. Allen, *The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): a review of recent research*. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(2): p. 272-9.
101. Bohn, M.J., T.F. Babor and H.R. Kranzler, *The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): validation of a screening instrument for use in medical settings*. J Stud Alcohol, 1995. **56**(4): p. 423-32.
102. Berner, M.M., L. Kriston, M. Bentele and M. Harter, *The alcohol use disorders identification test for detecting at-risk drinking: a systematic review and meta-analysis*. J Stud Alcohol Drugs, 2007. **68**(3): p. 461-73.
103. Reinert, D.F. and J.P. Allen, *The alcohol use disorders identification test: an update of research findings*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(2): p. 185-99.
104. Allen, J.P., R.Z. Litten, J.B. Fertig and T. Babor, *A review of research on the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)*. Alcohol Clin Exp Res, 1997. **21**(4): p. 613-9.
105. Aertgeerts, B., F. Buntinx, J. Bande-Knops, C. Vandermeulen, M. Roelants, S. Ansoms and J. Fevery, *The value of CAGE, CUGE, and AUDIT in screening for alcohol abuse and dependence among college freshmen*. Alcohol Clin Exp Res, 2000. **24**(1): p. 53-7.
106. McCusker, M.T., J. Basquille, M. Khwaja, I.M. Murray-Lyon and J. Catalan, *Hazardous and harmful drinking: a comparison of the AUDIT and CAGE screening questionnaires*. QJM, 2002. **95**(9): p. 591-5.
107. Pabst, A., Kraus, L., Piontek, D. & Müller, S. (2010) *Kurzbericht Epidemiologischer Suchtsurvey, Tabellenband: Trends der Prävalenz von Alkoholkonsum, episodischem Rauschtrinken und problematischem Alkoholkonsum nach Geschlecht und Alter 1995-2009*. 1-6.
108. Aertgeerts, B., F. Buntinx and A. Kester, *The value of the CAGE in screening for alcohol abuse and alcohol dependence in general clinical populations: a diagnostic meta-analysis*. J Clin Epidemiol, 2004. **57**(1): p. 30-9.
109. Mayfield, D., G. McLeod and P. Hall, *The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument*. Am J Psychiatry, 1974. **131**(10): p. 1121-3.
110. Neumann, T., L.M. Gentilello, B. Neuner, E. Weiss-Gerlach, H. Schurmann, T. Schroder, C. Muller, N.P. Haas and C.D. Spies, *Screening trauma patients with the alcohol use disorders identification test and biomarkers of alcohol use*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(6): p. 970-6.
111. Miller, P.M., C. Spies, T. Neumann, M.A. Javors, A.M. Hoyumpa, J. Roache, A. Webb, M. Kashi, F.E. Sharkey, R.F. Anton, B.M. Egan, J. Basile, S. Nguyen, M.F. Fleming and K.S. Dillie, *Alcohol biomarker screening in medical and surgical settings*. Alcohol Clin Exp Res, 2006. **30**(2): p. 185-93.
112. Spies, C.D., M. Kissner, T. Neumann, S. Blum, C. Voigt, T. Funk, N. Runkel and F. Pragst, *Elevated carbohydrate-deficient transferrin predicts prolonged intensive care unit stay in traumatized men*. Alcohol Alcohol, 1998. **33**(6): p. 661-9.
113. Raffael, A., Nebe, C. T. und Valet, G. , *Grundlagen der Durchflußzytometrie* Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. 1994: Schmitz, G., Rothe, G.
114. Pannu, K.K., E.T. Joe and S.B. Iyer, *Performance evaluation of QuantiBRITE phycoerythrin beads*. Cytometry, 2001. **45**(4): p. 250-8.
115. Matuschak, G.M., *Circulating cytokine concentrations and outcome prediction in intensive care unit patients: Still the tip of the iceberg?* Critical Care Medicine, 1996. **24**(11): p. 1769-1771.
116. Zhao, X.J., L. Marrero, K. Song, P. Oliver, S.Y. Chin, H. Simon, J.R. Schurr, Z. Zhang, D. Thoppil, S. Lee, S. Nelson and J.K. Kolls, *Acute alcohol inhibits TNF-alpha processing in*

- human monocytes by inhibiting TNF/TNF-alpha-converting enzyme interactions in the cell membrane.* J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2923-31.
117. Zhang, Z., G.J. Bagby, D. Stoltz, P. Oliver, P.O. Schwarzenberger and J.K. Kolls, *Prolonged ethanol treatment enhances lipopolysaccharide/phorbol myristate acetate-induced tumor necrosis factor-alpha production in human monocytic cells.* Alcohol Clin Exp Res, 2001. **25**(3): p. 444-9.
118. Boutten, A., M.S. Dehoux, N. Seta, J. Ostinelli, P. Venembre, B. Crestani, M.C. Dombret, G. Durand and M. Aubier, *Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(1): p. 336-42.
119. Zisman, D.A., R.M. Strieter, S.L. Kunkel, W.C. Tsai, J.M. Wilkowski, K.A. Bucknell and T.J. Standiford, *Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th1- and Th2-phenotype cytokines in murine Klebsiella pneumonia.* Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(3): p. 621-7.
120. Szabo, G., P. Mandrekar, L. Girouard and D. Catalano, *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, 1996. **20**(5): p. 900-7.
121. Kovacs, E.J. and K.A. Messingham, *Influence of alcohol and gender on immune response.* Alcohol Res Health, 2002. **26**(4): p. 257-63.
122. Garn, H., *Specific aspects of flow cytometric analysis of cells from the lung.* Exp Toxicol Pathol, 2006. **57 Suppl 2**: p. 21-4.
123. Cavaillon, J.M., C. Munoz, C. Fitting, B. Misset and J. Carlet, *Circulating cytokines: the tip of the iceberg?* Circ Shock, 1992. **38**(2): p. 145-52.
124. Friedland, J.S., J.C. Porter, S. Daryanani, J.M. Bland, N.J. Screatton, M.J. Vesely, G.E. Griffin, E.D. Bennett and D.G. Remick, *Plasma proinflammatory cytokine concentrations, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) III scores and survival in patients in an intensive care unit.* Crit Care Med, 1996. **24**(11): p. 1775-81.

Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	Effekte von Alkohol auf den Respirationstrakt _____	5
Abbildung 2:	Alveolarmakrophage in einem Alveolus _____	6
Abbildung 3:	Dot Plots der mit Anti-HLA-DR markierten Alveolarmakrophagen (grün) aus der BAL bei Patient 50. Ein Punkt entspricht einem Anti-HLA-DR Antikörper (SSC=Seitwärtsstreulicht, FSC=Vorwärtsstreulicht). _____	19
Abbildung 4:	Blick über das Bronchoskop auf den Eingang des rechten Mittellappens (weißer Pfeil) und Lungenunterlappen (schwarzer Pfeil) _____	19
Abbildung 5:	HLA-DR Messungen auf den AM absolut und in Relation _____	29
Abbildung 6:	TLR-Expression auf den AM gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units) _____	29
Abbildung 7:	Zytokinkonzentrationen (pg/10 ⁶ AM) ohne LPS-Stimulation und Inkubation _____	30
Abbildung 8:	Signifikante Zytokinkonzentrationen (pg/10 ⁶ AM) ohne Stimulation _____	31
Abbildung 9:	Zytokinkonzentrationen (pg/10 ⁶ AM) nach 4-stündiger LPS Stimulation _____	32
Abbildung 10:	Signifikante Zytokinkonzentrationen (pg/1 Mio. AM) nach 4h LPS Stimulation _____	32
Abbildung 11:	Zytokinkonzentrationen (pg/10 ⁶ AM) nach 24h LPS Stimulation _____	33
Abbildung 12:	IL-8 nach 24h LPS Stimulation (pg/10 ⁶ AM) _____	34
Abbildung 13:	HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ _____	35
Abbildung 14:	TLR 2- und 4 Expression auf den AM gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units) _____	36
Abbildung 15:	Zytokine unstimuliert (pg/10 ⁶ AM) _____	36
Abbildung 16:	Zytokine nach 4h LPS Stimulation (pg/10 ⁶ AM) _____	37
Abbildung 17:	Zytokine nach 24h LPS Stimulation (pg/10 ⁶ AM) _____	37
Abbildung 18:	TLR Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units) _____	38
Abbildung 19:	HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ _____	39
Abbildung 20:	Zytokine (pg/10 ⁶ AM) ohne LPS Stimulation _____	40
Abbildung 21:	Zytokine nach 4h LPS-Stimulation (pg/10 ⁶ AM) _____	40
Abbildung 22:	Zytokine nach 24h LPS-Stimulation (pg/10 ⁶ AM) _____	41
Abbildung 23:	TLR Expression gemessen als Fluoreszenzintensität (artificial units) _____	42
Abbildung 24:	HLA-DR Messungen der Subgruppen auf den AM absolut und relativ _____	42
Abbildung 25:	Zytokinkonzentrationen (pg/10 ⁶ AM) ohne LPS Stimulation _____	43
Abbildung 26:	Signifikante Zytokine (pg/10 ⁶ AM) ohne LPS Stimulation _____	44
Abbildung 27:	Zytokinkonzentrationen nach 4h LPS (pg/10 ⁶ AM) _____	45
Abbildung 28:	Konzentration von IL-10 nach 4h LPS (pg/10 ⁶ AM) _____	45
Abbildung 29:	Zytokinkonzentrationen nach 24 LPS (pg/10 ⁶ AM) _____	46

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Der AUDIT-Fragenkatalog	16
Tabelle 2:	Pipettierschema für HLA-DR-Messung	22
Tabelle 3:	AK-Mischungen für TLR-Messung	23
Tabelle 4:	Pipettierschema LPS-Stimulationen	24
Tabelle 5:	Allgemeine Basischarakteristika	26
Tabelle 6:	Alkoholspezifische Fragebögen, Werte und Biomarker	27
Tabelle 7:	Komorbiditäten	28
Tabelle 8:	Differentialblutbild	28
Tabelle 9:	Signifikanzen der unstimulierten Zytokine	31
Tabelle 10:	Signifikanzen nach 4h LPS Stimulation	33
Tabelle 11:	Signifikanzen nach 24h LPS Stimulation	34
Tabelle 12:	Subgruppen	34
Tabelle 13:	Subgruppenanalyse Gruppe B vs. Gruppe D	35
Tabelle 14:	Subgruppenanalyse Gruppe A vs. Gruppe B	38
Tabelle 15:	Signifikanzen der TLR Expression der Gruppe nAUD zwischen Rauchern und Nichtrauchern	39
Tabelle 16:	Signifikanzen der HLA-DR Expression Gruppe nAUD zwischen Rauchern und Nichtrauchern	39
Tabelle 17:	Subgruppenanalyse Gruppe A vs. Gruppe C	41
Tabelle 18:	Signifikanzen unstimulierter Zytokine der Nichtraucher beider Gruppen	44
Tabelle 19:	Signifikanz IL-10 nach 4h LPS Stimulation	46
Tabelle 20:	Veränderungen der Zytokinkonzentrationen im Alveolarraum durch chronischen Alkoholkonsum	63

Lebenslauf

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

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

Danksagung

Folgenden Wegbegleitern möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen:

Prof. Dr. Michael Sander, ehemaliger stellvertretender Direktor der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin Standort CCM, für die Realisierung und Überlassung des Dissertationsthemas, die jederzeit einforderbare, konstruktive Kritik und die zahlreichen Ratschläge, sowie für den tatkräftigen Einsatz bei den Bronchoskopien, trotz höherer Aufgaben und permanenten Zeitmangels.

Dr. Katharina Chalk, Fachärztin für Anästhesiologie (Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Standort CCM) für die langjährige und engagierte Betreuung der Arbeit.

Dr. Florian Bast und PD Dr. Matthias Hölzl und dem gesamten Team der Station 135, Klinik für HNO Charité Campus Mitte, für Ihre Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und für die Ermöglichung der Studie durch Patienten der Klinik.

Den an der Studie beteiligten Patienten und ihren Angehörigen in besonderer Weise, da sie diese Untersuchung erst ermöglichten.

Daniela Bayerl († 2010) für Deine sehr herzliche, perfekte und unermüdliche Einarbeitung sowie Anleitung im Labor. Du fehlst.

Meiner Familie, insbesondere meinem Onkel und Kollegen Dr. Christoph Hoffmann dafür, dass sie mir oft den Rücken freigehalten haben, für die gedankliche und finanzielle Unterstützung und dafür, dass sie oftmals meine Abwesenheit ausgehalten haben.

Den Mitarbeitern um und Dr. Christian Meisel persönlich (Institut für Medizinische Immunologie, Labordiagnostik CCM / CVK) für Ihre „LPS Proben, die Styroporboxen mit

Eis“ sowie für die zahlreichen Anleitungen und Feedbacks bezüglich der FACS Messungen.

Dem kompletten Team des anästhesiologischen Labors CVK, insbesondere Birgit Brendel und Dr. Clarissa von Haefen, Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Standort CVK, sowie dem Team des Zentrallabors CVK.

Abschließend möchte ich PD Dr. med. Dr. rer. nat. Felix Balzer für seine kritische Unterstützung und Beratung hinsichtlich der statistischen Auswertung recht herzlich danken.