

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

DISSERTATION

**Durch Ethanol hervorgerufene postoperative Veränderungen
der T-Zell-Subpopulationen T_H1, T_H2, T_H17 und T_{reg}, am
murinen Pneumoniemodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bianca Storim

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhalt

ABSTRAKT	5
1. EINLEITUNG	8
1.1 Alkoholismus	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Situation in Deutschland	8
1.1.3 Gesundheitliche und soziale Schäden durch exzessiven Alkoholkonsum	9
1.1.4 Alkoholismus in der täglichen Klinikroutine	9
1.2 Das Immunsystem und dessen Beeinträchtigung durch Alkoholkonsum	9
1.2.1 Spezifisches und unspezifisches Abwehrsystem des Körpers	9
1.2.2 CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen	11
1.2.3 T-Helferzellrelevante Marker	12
1.2.4 Auswirkungen von Alkoholkonsum auf die adaptive Immunantwort	14
1.3 Auswirkungen von operativem Stress auf die adaptive Immunantwort	15
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte und Instrumente	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Antikörper	21
2.1.4 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	22
2.1.5 Puffer, Lösungen, Medien	23
2.1.6 Hard- und Software	23
2.1.7 Versuchstiere	24
2.2. Methoden	25
2.2.1 Versuchsablauf	25
2.2.2 Gruppeneinteilung	26

2.2.3 Injektionen	26
2.2.4 Narkose und Operation	26
2.2.5 Applikation von <i>K. pneumoniae</i>	27
2.2.6 Erhebung des Clinical Scores	27
2.2.7 Euthanasie und Organentnahme	28
2.2.8 Entnahme der Organe und Aufbereitung der Lungenzellen	28
2.2.9 Entnahme der Organe und Aufbereitung der Zellen aus Milz.....	29
2.2.10 Stimulation	29
2.2.11 Oberflächenfärbung der Zellen	30
2.2.12 Fixierung der Zellen	30
2.2.13 Färbung intrazellulärer Zytokine	30
2.2.14 Durchflusszytometrische Bestimmung.....	31
2.2.15 Statistische Auswertung der ermittelten Zytokinwerte	33
2.2.16 Statistische Auswertung der Gewichte und des Clinical scores	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1 Körpergewicht der Versuchstiere	35
3.2 Clinical Score (CS)	38
3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung	40
3.3.1. FACS-Analyse der Lunge	43
3.3.2 FACS-Analyse Milz	55
4. DISKUSSION.....	66
4.1 FACS-Analyse: Alkohol- und Infektionseffekt auf T-Zell-Subpopulationen	67
4.1.1 T-Zellen.....	67
4.1.2 CD4 ⁺ T-Zellen	68
4.1.3 IFN- γ exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen	68
4.1.4 IL-4 exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen.....	71
4.1.5 IL-17 exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen	73
4.1.6 Foxp3 exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen.....	75
4.2 Körpergewicht und Clinical Score	77
4.3. Methodendiskussion	78
4.3.1 Balb/c-Maus	78
4.3.2. Alkoholverabreichung	79

4.3.3. Clinical Score	80
4.3.4. Operationsmodell.....	80
4.3.5. Infektions-Modell	81
4.3.6. Auswahl der untersuchten Organe	81
4.3.7. Durchflusszytometrische Analyse	81
4.4. Perspektiven	83
LITERATURVERZEICHNIS	85
ANHANG	95
Abbildungsverzeichnis.....	95
Tabellenverzeichnis.....	95
Abkürzungsverzeichnis.....	97
Eidesstattliche Versicherung	100
Lebenslauf.....	101
Publikationsliste.....	102
Danksagung.....	103

ABSTRAKT

Einleitung: Alkoholkonsum und operative Eingriffe haben immunsuppressive Wirkungen, die sich ggf. aufaddieren und somit von Bedeutung in der Intensivmedizin sind. Hier wird die Wirkung von Alkohol auf die postoperative Immunantwort von vier T-Helferzell-Subpopulationen (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg}) bei einer Pneumonie untersucht.

Methodik: Balb/c-Mäusen wurde 14 Tage Alkohol bzw. Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht, dann wurden sie operiert. Am Tag 16 erfolgte die Infektion mit *K. pneumoniae* bzw. eine Scheininfektion. Klinischer Zustand (Schleimhaut, Motorik, Fellbeschaffenheit) und Gewicht wurden dokumentiert. 24 und 48 Stunden nach der Infektion wurden T-Lymphozyten aus Milz und Lunge isoliert, immunfluoreszenzoptisch gefärbt und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich IFN- γ -, IL-4-, IL-17- und Foxp3-Expression untersucht.

Ergebnisse: Die Versuchstiere erholten sich nach Alkoholexposition oder *K. pneumoniae*-Infektion schlechter. Alkoholexponierte Tiere mit postoperativer *K. pneumoniae*-Infektion erholten sich am schlechtesten.

Während Alkoholexposition allein keinen Einfluss auf die Zahl aller Foxp3, IFN- γ bzw. IL-4 produzierenden $CD4^+$ -T-Zellen in der Lunge hatte, konnten 24 Stunden nach der *K. pneumoniae*-Infektion signifikant mehr IL-17 exprimierende $CD4^+$ -T-Zellen aus den Lungen von alkoholexponierten Tieren isoliert werden, als aus den infizierten Kontrolltieren ohne Alkoholbehandlung.

Unabhängig von der Alkoholbehandlung fanden sich in den Milzen *K. pneumoniae*-infizierter Tiere weniger IL-4, IL-17 bzw. Foxp3 produzierender $CD4^+$ T-Zellen. Die Zahl der $IL4^+$ -T-Zellen in den Milzen von nicht-alkoholexponierten/nicht-infizierten Tieren fiel im Verlauf von 24 bis 48 Stunden nach der Scheininfektion; dieser Effekt war bei den alkoholexponierten nicht-infizierten Tieren und bei allen *K. pneumoniae*-infizierten Tieren nicht darstellbar.

Während die Zahl der $CD4^+$ -T-Zellen in den Lungen *K. pneumoniae*-infizierter Mäuse 24 bis 48 Stunden *post infectionem* konstant blieb bzw. leicht fiel, stieg die $CD4^+$ T-Zellzahl bei den Kontrolltieren. Gleichzeitig fielen bzw. stiegen die Foxp3 exprimierenden T-Zellen nach der Infektion bzw. in der Kontrollgruppe. Die Zahl an IFN- γ exprimierenden T-Zellen in den Lungen der Kontrolltiere stieg im zeitlichen Verlauf, bei $IL-4^+$ T-Helferzellen war kein Trend erkennbar.

Schlussfolgerung: Eine isolierte *K. pneumoniae*-Infektion führte zu einem T_{H1}/T_{H2} -Shift in der Lunge zu Gunsten T_{H2} , zur Reduktion von T_{reg} -Zellen in Lunge und Milz sowie zur

Verminderung von T_H2- und T_H17-Zellen in der Milz. Nach isolierter Alkoholexposition ließ der fehlende Verlust von T_H2-Zellen in der Milz auf einen T_H1/T_H2-Shift schließen. Die Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion führte sowohl in der Lunge als auch in der Milz zu einer signifikanten Abnahme von T_{reg}-Zellen. Diese Reduktion erscheint durch die Infektion bedingt zu sein, was sinnvoll ist, da diese bekämpft werden muss.

Präoperativer Alkoholkonsum verändert die Expression von Foxp3, IL-4, IL-17 und IFN- γ exprimierenden CD4⁺T-Lymphozyten und fördert so durch eine Verschiebung der T-Zellverhältnisse die Entstehung und Unterhaltung einer Pneumonie durch *K. pneumoniae*.

Abstract: Postoperative changes in the T cell populations T_H1, T_H2, T_H17 and T_{reg} caused by ethanol on a murine model of pneumonia

Introduction: The consumption of alcohol and surgical procedures have immunosuppressant effects which may be additive and are therefore significant in intensive medicine. Here, the effect of alcohol on the postoperative immune response of four T helper cell sub-populations (T_H1, T_H2, T_H17 and T_{reg}) in a mouse pneumonia model are investigated. **Method:** BALB/c mice were administered alcohol or saline solution intraperitoneally for 14 days and then underwent laparotomy. On day 16, they were infected with *K. pneumoniae* or a dummy infection. The clinical condition (mucous membrane, motor function, fur quality) and weight were documented. Twenty-four and 48 hours after the infection, T lymphocytes from the spleen and the lungs were isolated, dyed using immunofluorescence and examined for their expression of IFN- γ -, IL-4-, IL-17- and Foxp3 using flow cytometry. **Results:** The experimental animals showed worse recovery after exposure to alcohol or *K. pneumoniae*. Animals who had been exposed to alcohol and with a postoperative *K. pneumoniae* infection showed the worst recovery. While alcohol exposure alone did not show any impact on the total number of Foxp3, IFN- γ or IL-4-producing CD4⁺ T cells in the lungs, 24 hours after the infection with *K. pneumoniae* significantly more IL-17-expressing CD4⁺T cells were able to be isolated from the lungs of animals which had been exposed to alcohol than from the infected control animals who had not been treated with alcohol. Independent of the treatment with alcohol, there were fewer IL-4, IL-17 and Foxp3-producing CD4⁺ T cells in the spleens of animals infested with *K. pneumoniae*. The number of IL4⁺ T cells in the spleens of animals

which had not been exposed to alcohol or infected decreased in the period from 24 to 48 hours after the dummy infection; this effect was not observed in the animals which had been exposed to alcohol but not infected or in any of the animals infected with *K. pneumoniae*. While the number of CD4⁺ T cells in the lungs of mice infected with *K. pneumoniae* remained constant or decreased slightly 24 to 48 hours *post infection*, the number of CD4⁺ T cells increased in the control animals. At the same time, the number of Foxp3-expressing T cells fell after infection and increased in the control group. The number of IFN- γ -expressing T cells in the lungs of the control animals increased over time; no trend was identified in IL-4⁺ T helper cells. **Conclusion:** An isolated infection with *K. pneumoniae* leads to a T_H1/T_H2 shift in the lungs to the benefit of T_H2, to the reduction of T_{reg} cells in the lungs and the spleen and to the reduction of T_H2 and T_H17 cells in the spleen. Following isolated exposure to alcohol, the missing loss in T_H2 cells in the spleen implies a T_H1/T_H2 shift. The combination of treatment with alcohol and infection leads to a significant decrease in T_{reg} cells in both the lungs and the spleen. This reduction appears to be caused by the infection, which makes sense as this has to be fought. Preoperative consumption of alcohol changes the expression of Foxp3, IL-4, IL-17 and IFN- γ -expressing CD4⁺T lymphocytes, thereby promoting the development and maintenance of pneumonia caused by *K. pneumoniae* as a result of a shift in T cell ratios.

1. EINLEITUNG

1.1 Alkoholismus

1.1.1 Definition

Die World Health Organization (WHO) definierte den Begriff 1952 folgendermaßen: „Alkoholiker sind exzessive Trinker deren Abhängigkeit vom Alkohol einen solchen Grad erreicht, dass sie deutliche geistige Störungen oder Konflikte in ihrer körperlichen und geistigen Gesundheit, ihren mitmenschlichen Beziehungen, ihren sozialen und wirtschaftlichen Funktionen aufweisen, oder sie zeigen Vorstadien einer solchen Entwicklung.“(1). Die Global Burden of Disease Studie der WHO kommt zu dem Ergebnis, dass in industrialisierten Ländern Alkohol nach Tabak und Bluthochdruck die dritthäufigste Ursache für verlorene Lebensjahre darstellt (2).

1.1.2 Situation in Deutschland

9,5 Millionen Menschen in Deutschland konsumieren Alkohol in gesundheitlich riskanter Form. Bei einer Gesamtbevölkerung von etwa 81 Millionen Menschen entspricht dies mehr als einem Zehntel der Bevölkerung (3). Etwa 1,3 Millionen Menschen gelten als alkoholabhängig. Jedes Jahr sterben in Deutschland nach neuen Berechnungen mindestens 73.000 Menschen an den Folgen ihres Alkoholmissbrauchs. Durchschnittlich werden pro Kopf der Bevölkerung jährlich zehn Liter reinen Alkohols konsumiert. Deutschland liegt im internationalen Vergleich im oberen Bereich (4). Der Verbrauch je Einwohner ist sehr schwankend und von sozialen und wirtschaftlichen Faktoren abhängig (Tab. 1). In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen dem Preis alkoholischer Getränke und dem Absatz beschrieben. Je höher der Preis, desto weniger wurde konsumiert (5).

Jahr	1900	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Liter	10,1	3,2	7,8	11,2	12,9	12,1	10,5	10,5	9,6	9,5

Tabelle 1: Verbrauch je Einwohner an reinem Alkohol bezogen auf Deutschland (6).

Insgesamt sind die gesellschaftlichen und volkswirtschaftlichen Schäden aufgrund von Alkoholkonsum nur schwer zu schätzen. Den jährlichen Einnahmen aus Alkoholsteuern von insgesamt 3,4 Milliarden € stehen ökonomische Folgekosten durch alkoholbedingte Morbidität und Mortalität von geschätzt 20,5 Milliarden € jährlich gegenüber (7).

1.1.3 Gesundheitliche und soziale Schäden durch exzessiven Alkoholkonsum

Zu den zahlreichen gesundheitlichen Schäden zählen Hepatopathien (Steatosis hepatis bis hin zur Zirrhose), Krebs, neurologische und psychische Störungen, Diabetes, kardiovaskuläre und Magen-Darm-Krankheiten, Infektionskrankheiten (durch die Kompromittierung des Immunsystems), perinatale Probleme (niedriges Geburtsgewicht, fetales Alkoholsyndrom), Alkoholvergiftungen, Unfälle, Selbstmorde und durch Gewalt verursachte Todesfälle. Neben den gesundheitlichen Schäden durch Alkoholkonsum sind die Konsequenzen im sozialen Bereich Betroffener nicht zu vernachlässigen. Zu nennen sind hier Gewalttätigkeit, Vandalismus sowie familiäre, interpersonelle, finanzielle Probleme und Schwierigkeiten bei der Arbeit (von Unfällen abgesehen) oder Erziehung (8, 9, 10, 11).

1.1.4 Alkoholismus in der täglichen Klinikroutine

Ein großer Teil der internistischen Krankheitsbilder ist mit chronischem Alkoholkonsum assoziiert. Chronisch Alkoholranke weisen eine längere Krankenhausverweildauer und eine wesentliche Erhöhung der postoperativen Morbidität und Mortalität auf. Bei chirurgischen Patienten ist chronischer Alkoholabusus mit einem drei- bis vierfachen Risiko für Infektionen, Sepsis, kardiologischen oder Blutungskomplikationen vergesellschaftet (12, 13). Eine kürzlich erschienene Studie der WHO legte dar, dass im Mittel etwa 20 % der nach einem Unfall in Notfallaufnahmen vorstelligen verletzten Patienten vor dem Unfall Alkohol getrunken hatten. Abhängig vom Erhebungsland und den jeweiligen kulturellen Unterschieden/Alkoholgesetzen wurden Patientenzahlen von 6 bis 45 % angegeben. Zudem seien Patienten, die kurz vor ihrem Unfall Alkohol konsumierten, eher wahrscheinlich starke Trinker und haben Vorerfahrungen mit alkoholassoziierten Problemen (14).

1.2 Das Immunsystem und dessen Beeinträchtigung durch Alkoholkonsum

1.2.1 Spezifisches und unspezifisches Abwehrsystem des Körpers

Unsere Umgebung enthält eine große Anzahl von infektiösen Organismen, wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten. Humorale Faktoren und Abwehrzellen dienen der Erkennung und Zerstörung dieser Pathogene, so dass die überwiegenden Mehrheit aller Infektionen nur kurzzeitig andauert und keinen dauernden Schaden hinterlässt.

Träger der **unspezifischen Immunabwehr**, die bereits bei der Geburt voll ausgebildet ist, sind humorale Faktoren (Lysozym, C-reaktives Protein, Interferone und das Komplementsystem), nicht –zellulärer Natur und in den Körperflüssigkeiten enthalten, sowie zelluläre Bestandteile (Granulozyten, phagozytierende Makrophagen und natürliche

Killerzellen (NK)). Während das unspezifische System eine „schnelle Eingreiftruppe“ darstellt, die Pathogene anhand weit verbreiteter Erkennungsmerkmalen (z. B. Lipopolysaccharide, Verlust von Histokompatibilitätsantigenen oder Opsonierung durch Antikörper) erkennt und anschließend abtötet, besitzt die **spezifische Immunabwehr** die Fähigkeit, auch auf seltene oder bis dato unbekannte, schädliche Strukturen mit einer angepassten Immunantwort zu reagieren. Die einmal gewonnenen Informationen über das Pathogen werden in einer Art immunologischem Langzeitgedächtnis abgelegt. Die Hauptzellen des spezifischen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten.

Die aus reifen **B-Zellen** gebildeten Plasma- und Gedächtniszellen spielen durch Bildung und Sekretion von Immunglobulinen eine wesentliche Rolle bei der humoralen Immunabwehr.

T-Zellen vermitteln zelluläre Immunreaktionen und können als zytotoxische T-Zellen virusinfizierte und entartete Zellen abtöten. Als T-Helferzellen sind sie zusammen mit antigenpräsentierenden Zellen an der Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen beteiligt. Für die Aktivierung und viele Effektorfunktionen (s. o.) von T-Zellen sind direkte Zell-Zell-Kontakte und die Wechselwirkung von zwei Rezeptoren ausschlaggebend: T-Zell-Antigenrezeptoren, die strukturelle Ähnlichkeit mit Immunglobulinmolekülen aufweisen, erkennen Histokompatibilitätsantigene auf Zielzellen. Anhand der Expression von Differenzierungsfaktoren (cluster of differentiation) auf der Zelloberfläche können CD8-positive T-Killerzellen von CD4-positiven T-Helferzellen (T_H) bzw. regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) unterschieden werden.

Zusätzlich spielen bei der Aktivierung von B- und T-Zellen noch weitere Signalstoffe, **Zytokine** eine wichtige Rolle. Zytokine sind eine große Gruppe von Molekülen, die in die Signalwege von Zellen der Immunantwort involviert sind. Es handelt sich um Proteine oder Glykoproteine. Zu den Subtypen der Zytokine zählen Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (8, 15). Auf einige für unsere Arbeit relevante Zytokine wird später explizit eingegangen. Die bereits genannten Histokompatibilitätsantigene sind Zelloberflächenmoleküle, die durch einen Genkomplex kodiert werden, der als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet wird. Beim Menschen werden diese MHC-Moleküle auch HLA (human leukocyte antigen) genannt. Die für die MHC-Moleküle kodierenden Genabschnitte werden in drei Gruppen eingeteilt: die Klasse I-, II- und III-MHC-Gene. Während die MHC-I-Moleküle für die Organabstoßung nach Transplantation und beim Ausschalten von virustransformierten

körpereigenen Zellen durch zytotoxische T-Zellen eine Rolle spielen, vermitteln die MHC-II-Moleküle die Interaktion zwischen T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen. Die Gene der Klasse III-MHC kodieren für einige Komplementkomponenten (15).

1.2.2 CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

CD4-positive T-Zellen (CD4⁺) werden in T_{reg} und konventionelle T_H eingeteilt. Zu den konventionellen T-Helfer-Zellen gehören T_{H1}-Zellen, T_{H2}-Zellen und T_{H17}-Zellen, die anhand der Zytokinmuster, die sie sezernieren, unterschieden werden (16).

T_{H1}-Zellen werden auch inflammatorische T-Zellen genannt. Diese Subpopulation entsteht nach Antigenkontakt in Anwesenheit von Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) und dem Wachstumsfaktor TGF- β (transforming growth factor- β). Das Hauptzytokin von T_{H1}-Zellen ist IFN- γ , welches Makrophagen aktiviert. **T_{H2}-Zellen** entwickeln sich nach Antigenpräsentation in Gegenwart von Interleukin-4 (IL-4) und sezernieren v. a. IL-4 und Interleukin-10 (IL-10). Ersteres ist ein Wachstumsfaktor für die T_{H2}-Zellen, die der B-Zell-Aktivierung und damit letztlich der Immunglobulinbildung dienen. Das gleichzeitig ausgeschüttete IL-10 hemmt andererseits die Aktivierung der Makrophagen. Umgekehrt hemmt IFN- γ die Vermehrung und Differenzierung der T_{H2}-Zellen. Ist also die Waage einmal in Richtung Entzündung gestellt, werden kaum mehr Immunglobuline gebildet. Umgekehrt werden Makrophagen nicht aktiviert, wenn durch die Proliferation der T_{H2}-Zellen die Reaktion auf eine Infektion in Richtung Immunglobulinbildung gestartet ist (8,15). Eine weitere beschriebene T-Zell-Subpopulation produziert selektiv Interleukin-17 (IL-17): **T_{H17}-Zellen**. Interleukin-6 (IL-6) und TGF- β sind entscheidend für die Initiierung der T_{H17}-Differenzierung aus naiven CD4⁺ Vorläuferzellen (10, 49). IL-17 produzierende T_{H17}-Zellen aktivieren Zellen der unspezifischen Immunantwort und wurden bei vielen Autoimmunerkrankungen inklusive Arthritis nachgewiesen (17).

Regulatorische T-Zellen hingegen sind Lymphozyten, die speziell Immunantworten unterdrücken, welche sich gegen den Wirt richten, zum Beispiel im Rahmen von Allergien oder Autoimmunerkrankungen, zum anderen dämpfen sie überschießende Immunreaktionen ein (18, 19). Sie entwickeln sich als Antwort auf die TGF- β - Signalkaskade durch die Induktion von Foxp3. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-6 wird die Differenzierung zu T_{reg} inhibiert, die von T_{H17}- Zellen jedoch induziert (20).

1.2.3 T-Helferzellrelevante Marker

Interleukine sind eine große Gruppe von Zytokine, die hauptsächlich von T-Zellen, aber teilweise auch von mononuklearen Phagozyten oder Gewebszellen produziert werden. Sie haben eine Vielfalt von Funktionen, viele bedingen die Teilung und Differenzierung von anderen Zellen.

IL-4 wird von T_H2-Zellen produziert und ist ein Wachstumsfaktor für die T_H2-Zellen, die der B-Zell-Aktivierung und damit letztlich der Immunglobulinbildung dienen (15). Zusammen mit IFN- γ inhibiert es die Entwicklung von T_H17-Zellen (21, 22).

IL-17 wurde erstmalig 1993 von Rouvier beschrieben, damals wurde es CTLA8 genannt (23). Später stellte sich heraus, dass es sich um eine neue Interleukin-Familie mit insgesamt 6 Mitgliedern handelt (IL-17A-F) (24, 25). IL-17A und wahrscheinlich IL-17F wird als Promotor der Granulopoese, der Neutrophilenakkumulation und der Aktivierung von Neutrophilen in Lunge, Gelenkflächen, zentralem Nervensystem und Darmgewebe beschrieben. Die Produktion von IL-17A und IL-17F von T-Lymphozyten wird von IL-23, welches von dendritischen Zellen produziert wurde, reguliert – unabhängig von Zell-zu-Zell-Kontakten (25). Ye untersuchte 2001 im Rahmen eines Mausmodells die Immunantwort von IL-17 nach einer Infektion mit *K. pneumoniae*. Hier wurde beschrieben, dass die Freisetzung von IL-17 als proinflammatorisches Zytokin mit der Neutrophilenrekrutierung und der Bakterienlast der Lunge korrelierte (26).

Interferone sind Zytokine, die besonders wichtig für die Limitierung der Ausbreitung einiger viralen Infektionen sind (27). Sie werden nach Rezeptorspezifität und Homologie der Sequenzen in Typ I und II eingeordnet. **IFN- γ** ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone. Es zeigt strukturelle Unterschiede zu Typ I-Interferonen, bindet an einen anderen Rezeptor und wird von separaten Chromosomensequenzen kodiert. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass nur T_H1-Zellen, zytotoxische Lymphozyten und natürliche Killerzellen IFN- γ produzieren. Im Verlauf zeigte sich, dass dies auch B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen tun (28). IFN- γ induziert MHC-Moleküle (sowohl Typ I als auch Typ II) auf antigenpräsentierenden Zellen. Es induziert Adhäsionsmoleküle und Chemokine auf dem Endothel. Außerdem aktiviert es Makrophagen zur mikrobiziden Aktivität und reguliert die Balance zwischen T_H1- und T_H2-Zellen (27). Wie bereits beschrieben fördert es die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in T_H1-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung der T_H2-Zellaktivierung. So moduliert IFN- γ die Immunantwort in Richtung einer proinflammatorischen T-Zellantwort (Abb. 1).

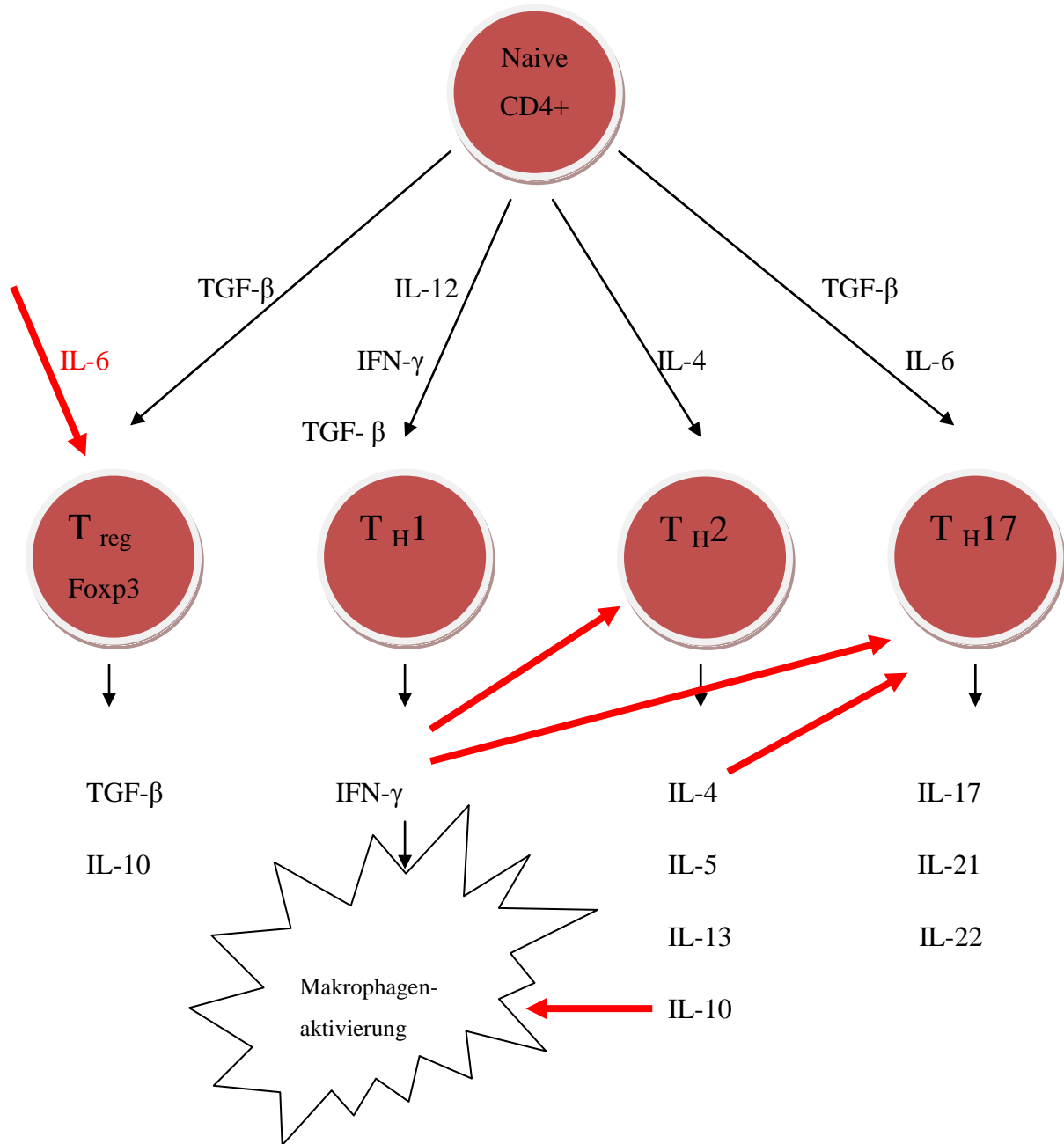


Abbildung 1. CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen und Zytokine. Spezifische Zytokinsignale induzieren die Differenzierung von naiven T-Zellen in verschiedene Subpopulationen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} und T_{reg}). Während die unterschiedlichen T_H-Zellen spezifische Muster von Zytokinen produzieren, die unterschiedlich gerichtete Immunantworten unterhalten, sezernieren regulatorische T-Zellen anti-inflammatorische Mediatoren, wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF-β. Foxp3 ist der Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen. Hemmende Eigenschaften einzelner Zytokine sind ebenfalls dargestellt (rote Pfeile).

Der Transkriptionsfaktor **Foxp3** wird als zuverlässiger Marker für T_{reg} betrachtet (29, 30). Diese sind funktionell als „Suppressorzellen“ charakterisiert, welche andere T-Helfer-Zellen supprimieren und nicht aktivieren. Gewebesanalysen ergaben, dass Foxp3 meist in

lymphatischem Gewebe nachweisbar ist (31). Die Expression von Foxp3 ist meist beschränkt auf CD4⁺, aber einige CD8⁺ Zellen exprimieren Foxp3 ebenfalls (29, 32) (Abb. 1).

1.2.4 Auswirkungen von Alkoholkonsum auf die adaptive Immunantwort

Chronischer und akuter moderater Alkoholkonsum erhöhen die Anfälligkeit eines Wirtes für virale und bakterielle Infektionen. Diese Einschränkung der **angeborenen Abwehr** scheint durch die Kombination aus einer Verminderung der Entzündungsantwort, einer beeinträchtigten Zytokinproduktion und einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen in der Leber bedingt zu sein. Außerdem ist die **erworbene zelluläre Immunität**, besonders die Antigen-spezifische Immunantwort, durch akuten und chronischen Alkoholkonsum beeinträchtigt. Obwohl auch die T-Lymphozytenfunktion direkt durch Ethanol beeinflusst wird, so scheint doch eine verminderte Funktion der antigenpräsentierenden Zellen Schlüsselement der Ethanol-induzierten Einschränkung der zellvermittelten Immunität zu sein. Ferner lassen erhöhte Immunglobulin-Spiegel chronischer Alkoholiker darauf schließen, dass bevorzugt T_H2-Zellen gegenüber T_H1-Zellen induziert werden (33). Es wurden des Weiteren molekulare Komponenten beschrieben, die die Auswirkung von Ethanol auf den Zelltod von CD4⁺ T-Lymphozyten belegen (34, 35, 36), woraus eine verminderte Anzahl von CD4⁺ T-Lymphozyten bei alkoholabhängigen Patienten resultiert.

Regelmäßiger Alkoholkonsum bedingt **bereits nach wenigen Tagen** eine phänotypische und funktionelle Veränderung der Immunparameter. So konnte am fünften Tag einer Alkoholdiät im Mausversuch sowohl eine Auswirkung auf die zelluläre Beschaffenheit der Milz, als auch eine Reduktion der B-Zellzahl und der Menge natürlicher Killerzellen (NK) nachgewiesen werden. Die Verminderung der B-Zellen wird von einer Verminderung der Expression von MHC-Komplexen dieser Population begleitet (37).

Alak et al. beschrieben 1993 erstmals eine signifikant verminderte Produktion von **IFN- γ** nach prolongierter Alkohol-Fütterung im Tierversuch, später wurde diese Beobachtung ebenfalls am murinen Modell bestätigt (38, 39). In einer weiteren Studie wurde dieser Effekt anhand einer alkoholvermittelten Verminderung IFN- γ -sezernierender CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen (40).

IL-4, als T_H2-Zytokin, wurde als Zeichen einer Hochregulation der T_H2-Antwort von Patienten mit ALD (Alcoholic liver disease) in Gallengangsepithelien nachgewiesen, während IFN- γ dort nicht exprimiert wurde (41).

IL-17 ist durch die Induktion der Granulopoese (via G-CSF) ausschlaggebend für die Immunantwort gegenüber *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), einem gram-negativem Bakterium (42). Es wurde im murinen Modell eine massive pulmonale Produktion von IL-17 nach Inokulation von *K. pneumoniae* nachgewiesen und Tiere mit defizienten IL-17-Rezeptoren wiesen nach der Infektion eine 100 %-ige Mortalität gegenüber der Kontrollgruppe mit 40 % auf (26). Hinsichtlich der Beeinträchtigung durch Alkoholexposition auf IL-17 gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen. Im Mausmodell wurden nach zweiwöchigem Alkoholkonsum eine supprimierte Freisetzung von IL-17 im Lungengewebe, eine verminderte Neutrophilenrekrutierung und eine erhöhte Mortalität nach Infektion mit *K. pneumoniae* beschrieben. Außerdem wurde in vitro ein direkter supprimierender Effekt von Alkohol auf die Freisetzung von IL-17 von Splenozyten bewiesen (43). Eine ebenfalls im murinen Modell induzierte Überexpression von IL-17, mittels rekombinatem, für IL-17 kodierendem Adenovirus, bedingte unter anderem eine lokale Induktion von dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und G-CSF sowie eine verbesserte Überlebensrate nach Infektion mit *K. pneumoniae* (44).

Erst kürzlich wurde in murinen Modellen die Auswirkung von chronischem Alkoholkonsum auf die **Foxp3**-Expression untersucht (45, 46). Hier zeigten sich keine Auswirkungen auf eine Veränderung, somit blieb die Anzahl regulatorischer T-Zellen unbeeinflusst.

1.3 Auswirkungen von operativem Stress auf die adaptive Immunantwort

Bereits 1958 wurde von Buinauskas et al. berichtet, dass das Immunsystem postoperativ supprimiert wird, was zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Tumorentstehung führt (32). Operativer Stress bedingt eine Verlagerung des Verhältnisses T_H1/T_H2 zugunsten von T_H2 . Daraus lässt sich schließen, dass die zellvermittelte Immunität herunter reguliert wird und die Antikörper-vermittelte Immunität postoperativ hochreguliert wird (41, 47).

Spies et al. untersuchten 2004 anhand einer prospektiven Studie 54 Langzeitalkoholiker und kam zum folgendem Ergebnis: Bei alkoholkranken Patienten ist das T_H1/T_H2 -Verhältnis im Vergleich zu Nichtalkoholikern bereits präoperativ reduziert. Während der Operation fiel das Verhältnis bei den Nichtalkoholikern ab und postoperativ kam es bei alkoholkranken und nicht alkoholkranken Menschen zum Verbleiben der Erniedrigung dieses Verhältnisses. Die

konsekutiv postoperativ inadäquate Bildung von zytotoxischen T-Zellen bedingte die Erhöhung der Infektionsrate bei Langzeitalkoholikern nach einer Operation (48).

1.4 *Klebsiella pneumoniae*

Gram-negative bakterielle Infektionen machen mehr als 50% der **nosokomialen Infektionen** aus. *K. pneumoniae* ist für einen substantiellen Teil dieser Infektionen verantwortlich (49). Beim Menschen ist *K. pneumoniae* als aerobes, gram-negatives Bakterium im Nasopharynx und dem Intestinum als Saprophyt präsent (50). Hinsichtlich des Erregerspektrums ist *K. pneumoniae* in 6 bis 8,6 % verantwortlich für **ambulant erworbene Pneumonien** (51, 52). Etwa 35 bis 66 % von den Patienten, die an der Infektion mit diesem Mikroorganismus sterben, sind Alkoholiker (53, 47). Die Mortalitätsrate der Alkoholiker mit *K. pneumoniae* Pneumonie liegt bei 50 bis 60 % (54, 55). Klinisch präsentiert sich die durch *K. pneumoniae* verursachte Pneumonie durch einen schnellen Ausbruch von akuten pulmonalen Symptomen mit der Produktion von dickem, beerengeleeartigem Sputum. Beträchtlich ist der Anteil der lokalen pyogenen Komplikationen wie Abszessen und Empyemen (56). Alkoholiker mit einer nachgewiesenen Bakteriämie von *K. pneumoniae* Pneumonie (BKPP) weisen trotz adäquater Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Behandlung ein fatales Outcome auf. Gründe dafür sind die hohe Virulenz der Mikroorganismen, die beeinträchtigte Immunantwort und die hohe Anfälligkeit für Infektionen (57). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass in Lungen von alkoholexponierten Mäusen, welche mit *K. pneumoniae* infiziert worden waren, eine verminderte Expression von IL-12 und IFN- γ stattfand. IL-12 treibt die Differenzierung von T_H1-Zellen an, wodurch es für die IFN- γ -Sekretion von entscheidender Bedeutung ist. Eine Reduktion von IL-12 und IFN- γ führte bei den alkoholbehandelten Mäusen zu einer erheblichen Suppression der bakteriellen Clearance in der Lunge und zu einem verminderten Überleben der Versuchstiere (39). Ebenfalls im murinen Modell wurden nach zweiwöchigem Alkoholkonsum eine supprimierte Freisetzung von IL-17 im Lungengewebe, eine verminderte Neutrophilenrekrutierung und eine erhöhte Mortalität nach *K. pneumoniae*-Infektion beschrieben (43).

Zusammenfassend lassen diese Untersuchungen darauf schließen, dass nach Alkoholkonsum und *K. pneumoniae*-Infektion durch Veränderungen der Zytokin- und T-Zell-Verhältnisse eine Immunsuppression entsteht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Suppression des Immunsystems durch Alkoholkonsum ist von immenser Bedeutung in der intensivmedizinischen Behandlung. Ebenso beeinflusst ein operativer Eingriff die immunologischen Funktionen. Beide mehrfach belegte Aussagen führen unabhängig voneinander zu einer verminderten Immunantwort im Rahmen einer Pneumonie, einer der häufigsten postoperativen Komplikation alkoholkranker Patienten.

Diese Immunsuppression führt auf Ebene der T-Zellen und deren Zytokinproduktion zu einer verminderten Eliminierung von bakteriellen Pathogenen und zu einer erhöhten Mortalität. Bisher wurde noch nicht ausreichend untersucht, wie eine Kombination aus präoperativem Alkoholkonsum und operativem Stress in Hinblick auf die vier T-Zell-Subpopulationen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg} wirken. Einzelne Pathomechanismen und Faktoren, die zu immunologischen Veränderung und der Entwicklung einer postoperativen Infektion bei alkoholkranken Patienten beitragen, können deshalb noch nicht ausreichend begründet werden. Um eine suffiziente Infektabwehr zu initiieren, ist die Differenzierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen aus naiven T-Zellen notwendig. Da verschiedene Studien Hinweise darauf ergaben, dass eine *K. pneumoniae*-Infektion neben einer Verminderung der T_{H1} -Antwort auch eine IL-17-Reduktion bedingt, sollen hier neben den T-Zell-Subpopulationen T_{H1} , T_{H2} , auch T_{H17} und T_{reg} untersucht werden.

Primäres Ziel dieser Arbeit ist also die Untersuchung der Wirkung von Alkohol und Operation auf die vier Subpopulationen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg} . Entsprechend wurden IL-17, Foxp3, IL-4, und IFN- γ untersucht. Das klassisch bestimmte T_{H1}/T_{H2} -Verhältnis mit Quantifizierung von IFN- γ und IL-4 wurde bereits ausführlich und wiederholt untersucht.

Hypothese:

Präoperativer Alkoholkonsum verändert die Expression von Foxp3, IL-4, IL-17 und IFN- γ exprimierenden CD4⁺T-Lymphozyten und fördert so durch eine Verschiebung der T-Zellverhältnisse die Entstehung und Unterhaltung einer Pneumonie, welche durch *K. pneumoniae* verursacht wurde.

Fragestellungen in Bezug auf unser murines operatives Modell:

- (1) Inwiefern wird das klinische Erscheinungsbild der Balb/c-Mäuse nach präoperativen Ethanolkonsum und einer postoperativen Pneumonie mit *K. pneumoniae* oder Sham-Infektion verändert?
- (2) Wie wirkt Ethanolkonsum auf den Anteil von Foxp3, IL-4, IL-17 und IFN- γ produzierender CD4⁺T-Lymphozyten?
- (3) Was bedingt die Induktion einer postoperativen Pneumonie mit *K. pneumoniae* bei zuvor bestehendem Ethanolkonsum auf den Anteil Foxp3, IL-4, IL-17 und IFN- γ produzierender CD4⁺T-Lymphozyten im Vergleich zu einer Sham-Infektion, als der nasalen Applikation von Kochsalz-Lösung ohne *K. pneumoniae*?
- (4) Wie wirkt sich die Kombination aus Infektion mit *K. pneumoniae* und Ethanolkonsum auf die genannten Subpopulationen der T-Helferzellen aus?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Allegra 21R Zentrifuge	Beckmann Coulter	München
Analysewaage	Scaltec	Göttingen
Brutschrank, CO ₂ -Inkubator	Sanyo	Bad Nenndorf
Cold Hot Pack 3M	3M Healthcare	Neuss
FACS Canto II	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg
Leica DM IL Mikroskop	Leica Microsystems	Wetzlar
Magnetrührer	Velp Scientifica srl	Usmate, Italien
Makrolon-Käfig Typ 3 mit Standarddeckel und Tränkflasche	Ebeco	Castrop-Rauxel
Modular Analytics PPP	Roche	Mannheim
Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold
Narkosegerät Sulla 800V, Vapor 19.3	Drägerwerk	Lübeck
OP-Besteck	Medka	Berlin
OP-Lampe Hanaulux 2001	Heraeus	Hanau
PC	HP xw4300 Workstation	Böblingen
Pipettierhelfer accu-jet	Brand	Wertheim
Pipetten 10µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Reagenzglasmixer Vortex	neoLab	Heidelberg
Sterilbank LaminAiR HB 2448	Hereaus	Hanau
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen
96-well Microtest Zellkulturplatte	Becton Dickinson Labware	Heidelberg

Tabelle 2. Verwendete Geräte und Instrumente.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Biohazard-Entsorgungsbeutel	Kleinfeld Labortechnik	Gehrden
Decktuch steril, 130x300mm	Charité Wedding, WIPAC medical	Berlin
Einmal-Injektionskanüle, Microlance 3	Becton Dickinson Labware	Heidelberg
Einmalspritze Standard 5ml	Becton Dickinson Labware	Heidelberg
Einmalspritze 1ml	Becton Dickinson Plastipak	Madrid, Spanien
Konische Polypropylen-Röhrchen BD Falcon Conical Tube 15 & 50ml	BD Biosciences	Le Pont de Claix, Frankreich
Krankenhaus-Fertigrasierer	Wilkinson Sword	Solingen
Latex-OP-Handschuhe Gammex-PF steril	Ansell	Cergy, Frankreich
Nahtmaterial Vicryl 5-0, V925H 70cm	Johnson & Johnson	St. Steven, Belgien
Pasteurpipetten, PE-LD, 3.5ml	Brand	Wertheim
Pipettenspitzen steril für Pipetten 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhre mit Eindrückstopfen, 13ml	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht
Rollenpflaster Transpore white, 2,5cm	3M Medica	Neuss
Rundbodenröhre BD Falcon Round Bottom Tubes 13x100mm, 17x120mm	BD Biosciences	Le Pont de Claix, Frankreich
Sereologische Pipetten aus Glas 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Biosciences	Le Pont de Claix, Frankreich
Sprühpflaster Band-AID	Johnson & Johnson	Norderstedt
Untersuchungshandschuhe	Nitrotex	Brüssel, Belgien
Zellsiebe steril „Cell Strainer Nylon“ 70µm	BD Biosciences	Le Pont de Claix, Frankreich

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien.

2.1.3 Antikörper

Name	Hersteller	Klon	Konzentration
Pacific Blue Hamster anti-Mouse CD3	BD Bioscience	500A2	0,2 mg / ml
APC-H7 Rat anti-Mouse CD4	BD Bioscience	GK1.5	0,2 mg / ml
PerCP Rat anti-Mouse CD8a	BD Bioscience	53-6.7	0,2 mg / ml
Pacific Blue Hamster IgG2, κ Isotype Control	BD Bioscience	B81-3	0,2 mg / ml
APC-H7 Rat IgG2b, κ Isotype Control	BD Bioscience	A95-1	0,2 mg / ml
PerCP Rat IgG2a, κ Isotype Control	BD Bioscience	R35-95	0,2 mg / ml
FITC Rat Anti-Mouse IFN γ	BD Bioscience	XMG1.2	0,5 mg / ml
APC Rat Anti-Mouse IL-4	BD Bioscience	11B11	0,2 mg / ml
PE Rat Anti-Mouse IL-17	BD Bioscience	TC11-18H10	0,2 mg / ml
Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) anti- mouse/rat Foxp3	eBioscience	FJK-16s	0,2 mg / ml
FITC Rat IgG1, κ Isotype Control	BD Bioscience	R3-34	0,2 mg / ml
APC Rat IgG1, κ Isotype Control	BD Bioscience	R3-34	0,2 mg / ml
PE Rat IgG1, κ Isotype Control	BD Bioscience	R3-34	0,2 mg / ml
Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) Rat IgG2a Isotype Control	eBioscience	eBR2a	0,2 mg / ml
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, Cat. No. 553141, 553142)	BD Bioscience	2.4 G2	0,5 mg / ml
Anti-Rat and Ant-Hamster IG κ Negative Control Compensation	BD Bioscience		

Tabelle 4. Antikörper.

2.1.4 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Albumine Serum	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim
Alkohol-Konzentrat 95 % Braun	Braun Melsungen AG	Melsungen
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg
Band-Aid Sprühpflaster	Johnson & Johnson	Norderstedt
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer HealthCare AG	Leverkusen
Cytofix/Cytoperm Solution Fixation und Permeabilization	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien
Descosept, alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld- Beiseförth
Dormicum 5mg/ml (Midazolamhydrochlorid)	Hoffmann-La Roche	Grenzach- Wyhlen
Fetales Bovines Serum (hitzeinaktiviert, 30 min, 56 °)	GIBCO Invitrogen	Raisley, Schottland
Golgi-Stop (Protein Transport Inhibitor)	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien
Ionomycin calcum salt from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim
Isofluran-Forene, 250 ml	Abbott GmbH & Co KG	Wiesbaden
Isotone Kochsalzlösung, 250 ml	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg
Ketamin 50 mg (Ketaminhydrochlorid), 10 mg / ml	Deltaselect GmbH	Dreieich
2-Mercaptoethanol, cell culture tested liquid	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim
Natriumchlorid 0,9 %, Ampullen à 10 ml	Braun Melsungen AG	Melsungen
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim
Penicillin /Streptomycin 100 ml	Biochrom AG	Berlin
Perm Wash Buffer	BD Biosciences	Erembodegem,

		Belgien
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim
Softasept, alkoholische Lösung zum Aufsprühen auf die Haut	Braun Melsungen AG	Melsungen
Trypan Blue, 5 g	Sigma	St. Louis, Frankreich

Tabelle 5. Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.

2.1.5 Puffer, Lösungen, Medien

Hepes Buffer: Biochrom AG, Berlin

Erylysepuffer: Buffer EL Erythrocyte lysis, Quiagen GmbH, Hilden

Lysoform D: Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, verwendet als 5 %-ige Lösung

2-Mercaptoethanol (50 mM Lösung): 3,4065 g 2-Mercaptoethanol / 1 l destilliertes Wasser

PBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline) without Ca & Mg: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

PB (0,2 % PBS-BSA): 500 ml PBS / 1 g Albumin Bovine Serum / steril filtriert

RPMI 164 Medium (Zellkulturmedium, nach dem Roswell Park Memorial Institute, in dem es entwickelt wurde, RPMI genannt) 2.0 g / l NaHCO₃, stabile glutamin, very low endotoxin): Biochrom AG Berlin

RPMI Medium komplett: 440 ml RPMI, 50 ml hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml Hepes Buffer, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 500 µl 2-β-Mercaptoethanol

Percoll: Separating Solution, Density 1,124 g / ml Biochrom AG, Berlin

Percoll (40%ige Lösung): 32 ml Percoll + 49 ml RPMI komplett Medium

Percoll (70%ige Lösung): 33,6 ml Percoll + 14,4 ml RPMI komplett Medium

Trypan Blue Solution: 0,9 g NaCl, 0,5 g Trypanblaufarbstoff, 100 ml Aqua dest

2.1.6 Hard- und Software

FACSDiva Version 6.1.1	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software. Inc.	San Diego, California, USA
SPSS Version 14	SPSS Inc.	Chicago, IL, USA

Tabelle 6. Hard- und Software.

2.1.7 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung (Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM)) unter Leitung von Hrn. Dr. med. vet. S. Nagel, Charité Universitätsmedizin-Berlin, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin durchgeführt. Die Zustimmung der örtlichen Tierschutzkommission lag vor. Alle Protokolle wurden nach den Richtlinien zum Schutz und zur Verwendung von Versuchstieren durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin (LAGetSi) im Rahmen des Tierversuchsantrages G 0213/05 bewilligt.

Die weiblichen Balb/c-Mäuse wurden von der Zuchtstation Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Dort wurden sie unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gezüchtet. Die Balb/c-Mausmodelle sind in der Alkohol- und Infektionsforschung sowie zur Durchführung chirurgischer Eingriffe etabliert (37, 58, 59). Nach der Lieferung der Mäuse erfolgte eine Adaptationsperiode von einer Woche. Hierbei wurden die Tiere maximal in Zehnergruppen in individuell belüfteten Käfigen (IVC, Individual ventilated Cages) der Firma Tecniplast verteilt. Die Haltung erfolgte tierschutzgerecht unter folgenden Bedingungen: Temperatur 23 °C (+/-1 °C), relative Luftfeuchte 50 % (+/-10 %), kontinuierlichem Licht-Dunkel-Wechsel zwölfstündlich. Standardtrockenfutter und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere neun Wochen alt. Nach Angaben der Züchter gelten Mäuse ab einem Alter von 3 Monaten als erwachsen. In der Zucht können Balb/c Mäuse aber bereits ab einem Alter von 8-10 Wochen effizient eingesetzt werden. Entsprechend befanden sich unsere Tiere noch im Wachstum, was wir in der Beurteilung des Gewichtsverlaufes berücksichtigen mussten. Der Umgang mit den Tieren im Rahmen der Versuche erfolgte stets unter Lamina Flow Werkbänken. Zur Identifizierung einzelner Tiere wurden die Mäuse gekennzeichnet. Der gesamte Versuch in Bezug auf Tierhaltung, Alkoholapplikation, Pneumonie-Induktion mittels *K. pneumoniae*, Operation, klinische Bewertung des Krankheitsverlaufes sowie Tötung und Präparation erfolgte nach den veröffentlichten Protokollen unserer eigenen Arbeitsgruppe (59, 60).

2.2. Methoden

2.2.1 Versuchsablauf

Nach oben genannter Eingewöhnungsphase wurde den Mäusen 14 Tage lang Alkohol bzw. den Tieren der Vergleichsgruppen physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Alle Tiere wurden am Tag 14 operiert. Am Tag 16 erfolgte die Infektion mit *K. pneumoniae*. Gruppen, die mit den Infektionsgruppen verglichen werden sollen, wurden einer Vehikel-Infektion (Sham-Infektion) unterzogen. Zur Beurteilung des klinischen Befindens der Tiere wurde an jedem Tag des Versuchs der klinische Zustand bewertet und das Gewicht ermittelt (Tab. 7). Um einen zeitlichen Verlauf über Immunantwort zu erhalten, wurden die Tiere 24 sowie 48 Stunden nach der Infektion getötet, Milz und Lunge wurden entnommen, und schließlich wurden T-Lymphozyten präpariert, gefärbt und mittels FACS-Analyse untersucht (s. u.). Man entschied sich für die Untersuchung dieser Organe, da die Milz die systemische, dagegen die Lunge die lokale Auswirkung der untersuchten T-Zell-Subpopulationen auf die Infektion aufzuzeigen vermag (61).

Tag	1-13	14	15	16	17	18	19
Erhebung	Klinik	Klinik	Klinik	Klinik	Klinik	Klinik	
	Gewicht	Gewicht	Gewicht	Gewicht	Gewicht	Gewicht	
Injektion (i.p.)	EtOH NaCl	EtOH NaCl					
Eingriff		Operation		Infektion: Sham / <i>K. pneumoniae</i>	Tötung der 24 h- Gruppen	Tötung der 48 h- Gruppen	
Weiteres Vorgehen					Präparation der 24 h- Gruppen	FACS der 24 h- Gruppen Präparation der 48 h- Gruppen	FACS der 48 h- Gruppen

Tabelle 7. Versuchsablauf

2.2.2 Gruppeneinteilung

Die Versuchsgruppen wurden anhand der Vorbehandlung (NaCl oder Ethanol), der Infektion (Sham oder *K. pneumoniae*) sowie anhand des Tötungszeitpunktes in Stunden (h) eingeteilt (Tab. 8).

Gruppe + Infektion	Tötungszeitpunkt nach Infektion in Stunden (h)	Anzahl	Name
NaCl i.p. + Sham	24	8	NaCl Sham 24
Ethanol i.p. + Sham	24	8	EtOH Sham 24
NaCl i.p. + <i>K. pneumoniae</i>	24	8	NaCl Klebs 24
Ethanol i.p. + <i>K. pneumoniae</i>	24	7	EtOH Klebs 24
NaCl i.p. + Sham	48	8	NaCl Sham 48
Ethanol i.p. + Sham	48	8	EtOH Sham 48
NaCl i.p. + <i>K. pneumoniae</i>	48	8	NaCl Klebs 48
Ethanol i.p. + <i>K. pneumoniae</i>	48	7	EtOH Klebs 48

Tabelle 8. Gruppeneinteilung.

2.2.3 Injektionen

Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte über den Zeitraum von 14 Tagen die intraperitoneale Applikation von physiologischer Kochsalzlösung bzw. Ethanol täglich um 8:30 Uhr. Hierbei wurde gewichtsadaptiert 3,0 mg Ethanol pro Gramm Körpergewicht bzw. das entsprechende Volumen an Kochsalzlösung appliziert (59).

2.2.4 Narkose und Operation

Zur Inhalationsnarkose wurde das Narkosegerät Sulla 800V verwendet. Die Einleitung erfolgte mit 0,8 l Sauerstoff und 4 % Isofluran, wobei die Maus mit dem Kopf in eine schräg zugeschnittene Spritze (20 ml Volumen) gelegt wurde, über die das Narkotikum einströmte. Nach Erreichen einer angemessenen Narkosetiefe wurde die Maus in Rückenlage auf ein vorgewärmtes Coolpack, welches mit Alufolie bedeckt wurde, mit Pflasterstreifen fixiert. Zur Protektion der Cornea wurden die Augen der Tiere mit Bepanthen-Augensalbe bestrichen.

Die Narkose wurde mit einem Gasgemisch von 0,8 l Sauerstoff und 2 % (+/- 0,5 %) Isofluran aufrecht erhalten.

In Rückenlage erfolgte die Desinfektion und Rasur des Abdomens, und das Abdecken mit sterilen Lochtüchern. Nun wurde eine mediane Laparotomie vom mittleren Unterbauch etwa 2 cm nach kranial durchgeführt. Anschließend wurde das Peritoneum mittels fortlaufender Naht und die Haut mittels Einzelknopfnähten adaptiert (Vicryl 5/0). Der gesamte Eingriff erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Beendigung der Narkose wurde die Wunde mit Sprühverband versorgt und das Tier bis zum vollständigen Erwachen überwacht. Um einem Temperaturverlust vorzubeugen, wurden die Käfige postoperativ temporär bis zum Wiedererwachen unter eine Wärmelampe gestellt.

2.2.5 Applikation von *K. pneumoniae*

Bei den Infektionsgruppen wurde in Midazolam/Ketamin-Narkose mit einer Dosis von 100 mg / kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 4 mg / kg KG Midazolam tröpfchenweise intranasal die Applikation von *K. pneumoniae* durchgeführt. Die Erreger wurden vom Robert-Koch-Institut zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um *Klebsiella pneumoniae* strain 43816 (ATCC, Rockville, MD, USA) Trevisan Serotype 2. Jede Maus erhielt 6×10^4 KBE / 50 μ l NaCl 0,9 %. Alle Interventionen, die mit diesen Erregern im Zusammenhang standen, wurden unter entsprechend verschärften Hygienebedingung (Schutzbekleidung, Spezialentsorgung, u.a.) durchgeführt. Im Rahmen der Sham-Infektion wurde ebenfalls unter Narkose 50 μ l Kochsalzlösung nasal verabreicht.

2.2.6 Erhebung des Clinical Scores

Die Versuchstiere wurden während des Versuchsablaufes täglich gewogen. Außerdem wurden zur objektiven Einordnung des Allgemeinzustandes der Tiere folgende klinische Merkmale dokumentiert:

Die **motorische Aktivität** wurde mittels eines Scores von 0 bis 4 bewertet, wobei ein Score von 0 einer normalen Aktivität entsprach und sich über Verlangsamung zur Passivität und schließlich fehlenden Aktivität (Score 4) einteilen ließ. Die **Piloerektion** wurde in ähnlicher Weise beurteilt. Hierbei erhob man bei keiner Piloerektion und normalem, gepflegtem Haarkleid einen Score von 0. Über leichte und mittlere Veränderungen, erhielt eine starke Piloerektion einen Score von 4. Letztlich wurde die **Schleimhaut** bewertet. Während eine unauffällige Beschaffenheit 0 Punkte ergab, wurden über leichte Rötungen und Sekretion bei sehr starker Reaktion 4 Punkte erhoben. Zur Auswertung wurden für jedes Tier die Werte

addiert. Je höher die Punktezahl, desto schlechter war der klinische Zustand des Tieres. Anschließend erfolgte eine statistische Analyse, auf die später eingegangen wird.

2.2.7 Euthanasie und Organentnahme

Die Tötung erfolgte durch einen Genickbruch nach einer Überdosis mit Ketamin und Midazolam (250 mg / kg KG Ketamin und 100 mg / kg KG Midazolam). Anschließend wurden die Tiere unter der sterilen Werkbank auf einer mit Aluminiumfolie bedeckten Arbeitsplatte aufgespannt und das Abdomen gründlich desinfiziert. Zur Präparation wurde die Bauchhaut median bis zur Mandibula eröffnet und vom Peritoneum gelöst. Anschließend wurden Peritoneum und Diaphragma inzidiert, so dass der Brustkorb und die Abdominalhöhle freigelegt werden konnten.

Bei der Entnahme von Milz und Lunge wurde darauf geachtet, adhärentes Pankreas-, Lymph- und Thymusgewebe abzulösen.

2.2.8 Entnahme der Organe und Aufbereitung der Lungenzellen

Nach der Entnahme der Lungen wurden diese anschließend sofort in PB auf Eis gelagert, bis sie wiederum mit PB durch das Zellsieb gerieben wurden, so dass in einem 50 ml Tube die 15 ml -Markierung erreicht wurde. Nach Zentrifugation (bei 1500 rpm bei Raumtemperatur (RT) für 5 bis 7 Minuten), wurde der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 10 ml 40 %-igem Percoll aufgenommen und mit einer unsterilen Pipette resuspendiert. Hiervon wurden je 5 ml auf 3 ml 70 %-igem Percoll überschichtet. Nach der folgenden Zentrifugation (30 Minuten bei 1900 rpm bei RT ohne Bremse und ohne Beschleunigung) wurde die Interphase mit einer sterilen Einwegpipette abgesaugt und in 40 ml kaltes Komplett-Medium gegeben. Nun wurde wieder zentrifugiert (1500 rpm /RT/ 5-7 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml PB aufgenommen. Zum Zählen der Zellen wurde ein 20 µl Aliquot 1:1 mit Trypanblau verdünnt (markiert tote Zellen und Debris) und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Gesamtzellzahl errechnete sich anschließend wie folgt:

Zellzahl in 16 Kästchen x Kammerfaktor (10^4) x Verdünnungsfaktor (2) x Volumen in ml = Zellzahl in der Zellsuspension.

Währenddessen wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1500 rpm, RT, 5 bis 7 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zu einer Konzentration von 10×10^6 / ml aufgenommen.

2.2.9 Entnahme der Organe und Aufbereitung der Zellen aus Milz

Nach der Entnahme wurden die Organe in PB sofort auf Eis gelagert, bis sie mit PB durch ein Zellsieb gerieben wurden, so dass in einem 50 ml-Tube die 15 ml-Markierung erreicht wurde. Es erfolgte das Zentrifugieren bei 1500 rpm und RT für 5 bis 7 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Zur Zerstörung und Entfernung der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 3 ml Erylysepuffer mit einer Einwegpipette resuspendiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurde das Tube bis zu der 20 ml-Markierung mit PB aufgefüllt.

Nach Zentrifugation (bei 1500 rpm bei RT für 5 bis 7 Minuten) wurde der Überstand verworfen, anschließend die Zellen in 10 ml PB aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde ein 20 µl Aliquot mit 80 µl Trypanblau angefärbt und gezählt.

Die Zellzahl in der Suspension berechnete sich wie folgt:

Zellzahl in 16 Kästchen x Kammerfaktor (10^4) x Verdünnungsfaktor (5) x Volumen in ml
= Zellzahl in der Zellsuspension.

Die Zellsuspension wurden mit PB bis zu der 20 ml -Markierung aufgefüllt, für 5-7 Minuten bei RT zentrifugiert (1500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Konzentration von 10×10^6 / ml aufgenommen.

Von nun an wurden die folgenden Methodenschritte mit den Zellsuspensionen beider Organe auf die gleiche Weise durchgeführt. Pro Messung wurde für jedes Organ, vor allem für jeden Antikörper und Farbe, eine Isotypenprobe mit gemessen, um unspezifische Bindungen der Antikörper in der Auswertung abziehen zu können. Des Weiteren wurden „ungefärbte Zellen“ derselben Messung unterzogen, um die Zellpopulation in der Messung zu detektieren.

2.2.10 Stimulation

Dieser Schritt erfolgte zur Anregung der Zytokinproduktion durch die Zellen. Je 200 µl Zelllösung und 800 µl RPMI Komplettmedium wurden in einem FACS-Röhrchen aufgenommen. Die eigentliche Stimulierung der Zellen erfolgte mittels PMA und Ionomycin:

PMA wurde bei -20 °C gelagert und à 5 µl aliquotiert. 995 µl PBS wurde hinzugefügt. Ionomycin wurde bei -20 °C gelagert und à 20 µl aliquotiert. Nach Zugabe von 180 µl PBS wurden 100 µl PMA-Endlösung und 200 µl Ionomycin-Endlösung vermengt. Davon wurden 15 µl in jedes Röhrchen gegeben.

Es schloss sich eine Inkubation für vier Stunden bei 37 °C im CO₂-Brutschrank an. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe von Golgi-Stop, um weiteres Austreten von Zytokinen aus dem Golgi-Apparat zu verhindern.

2.2.11 Oberflächenfärbung der Zellen

Die Zellsuspension wurde zweimalig mit PB gewaschen und für 5 bis 7 Minuten bei RT zentrifugiert (1500 rpm). Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Vorgang wiederholt. Nun wurde 50 µl Fc Block-Lösung (4 µl Fc Block in 46 µl PB) zur Vermeidung unspezifischer Bindungen in jedes Röhrchen gegeben. Dies ist notwendig, da FcγII (CD32) and FcγIII (CD16) als niedrig-affine Rezeptoren für aggregierte IgG von vielen Zellen, inklusive B-Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert werden. Hieraus resultiert, dass einige Antikörperlösungen über Ihre Fc-Domäne an diese Zellen binden und so eine hohe Hintergrundfärbung resultiert. Der von uns verwendete Mouse BD FC Block ist ein aufgereinigter, monoklonaler IgG_{2b} Antikörper gegen murines CD16/CD32.

Nach Inkubation im Dunkeln auf Eis für 5-10 Minuten wurde der Antikörper-Mix (4 µl CD3 Pacific Blue, 4 µl CD4 APC-H7, 14 µl CD8 PerCP pro Probe) beigemischt und für 25 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert.

2.2.12 Fixierung der Zellen

Nach Waschen mit kaltem PBS wurde bei RT 5-7 Minuten zentrifugiert (1500 rpm) und der Überstand verworfen. Jede Zellprobe wurde in 500 µl Perm-Fix-Puffer (1:10 verdünnt) resuspendiert. Die Fixation erfolgte bei RT für 10 Minuten im Dunkeln. Nach Waschen mit PB und Zentrifugieren (1500 rpm, RT, 5-7 Minuten) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200-300 µl PB resuspendiert und bis zum Folgetag im Dunkeln bei 4° C gelagert.

2.2.13 Färbung intrazellulärer Zytokine

Nach erneutem Waschen in PB und Zentrifugation (1500 rpm, RT, für 5-7 Minuten) wurde das Zellpellet mit 1 ml Perm-Wash, welches 1:10 verdünnt wurde, resuspendiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT und erneuter Zentrifugation (1500 rpm, bei RT für 5-7 Minuten) wurde der Überstand entfernt und 50 µl Fc-Block-Lösung (4 µl Fc Block in 46 µl PB) hinzugegeben. Wiederum wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nun fand die Zugabe von Wash-Perm-intrazellulärer Antikörper-Lösung (pro Probe 2 µl IFN- γ FITC, 2 µl IL-4 APC, 2 µl IL-17 PE, 2 µl Foxp3 PE-Cy7 sowie 22 µl Wash-Perm) statt. Des Weiteren wurde den Isotypen-Kontrollen der Isotypen-Mix (2 µl Iso FITC, 2 µl Iso APC, 2 µl Iso PE, 2 µl Iso PE-Cy7 sowie 22 µl Wash-Perm) beigefügt. Es schloss sich zur intrazellulären Färbung eine Inkubation für 25 Minuten auf Eis im Dunkeln an.

Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde mit 1 ml Wash-Perm zentrifugiert (1500 rpm / RT / 5-7 Minuten) und der Überstand verworfen. Hierbei konnte der gebundene Antikörper-Komplex aufgrund seiner Größe nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren. Anschließend wurde das Pellet in PBS gewaschen, um die geöffneten Poren zu verschließen. Zur FACS-Analyse wurde das Pellet in 200-300 µl PB resuspendiert.

2.2.14 Durchflusszytometrische Bestimmung

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem Gerät FACS Canto II der Firma Becton Dickinson Biosciences nach Protokollen und Angaben des Herstellers.

Eine Eigenschaft der Zelle, die in der Durchflusszytometrie gemessen wird, ist das Streulicht. Diese wird durch eine den Laserstrahlkreuzende Zelle verursacht. Je grösser eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen.

Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem von der Größe der Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes Signal.

Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark vom Inhalt einer Zelle ab. Finden sich in der Zelle viele Lysosomen, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht und umgekehrt (62).

Um die Ergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt, in dem auf der x-Achse das Vorwärts- auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen wird. Einzelne Zellpopulationen, wie z. B. Lymphozyten, können anhand von Größe und Granularität identifiziert werden, so dass man manuell ein sog. „Gate“ setzen kann, um sich bei nachgeschalteten Analysen auf diese Zellpopulation beziehen zu können.

Zur Differenzierung von Zellmembranproteinen, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren werden spezifische Antikörper verwendet (s. o.). Antikörper unterschiedlicher Spezifität sind

mit fluoreszierenden Gruppen konjugiert, welche (z. B. nach Anregung mit einem Laser) Licht mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren emittieren (Tab. 9). Die Expression eines Merkmals korreliert somit mit der Stärke des Fluoreszenzsignals nach der Färbung. Unsere Messungen erfolgten am FACS CANTO II der Firma Becton-Dickinson. Das Gerät verfügt über drei Laser und zehn Fluoreszenzkanäle. Damit ist eine zeitgleiche Analyse von bis zu zehn Farben möglich.

Laser	Anregungs- wellenlänge (nm)	Fluorochrom	Abkürzung	Emissions- -maxima (nm)	Emissions- farbe
Solid State (Festkörperlaser)	488	Fluorescein Isothiocyanat	FITC	519	Grün
		Phycoerythrin	PE	578	Gelb
		Peridinin Chlorophyll Protein	PerCP	678	Rot
		Phycoerythrin- Cychrom7	PE-Cy7	785	Infrarot
Helium-Neon- Laser	633	Allophycocyanin	APC	660	Rot
		Allophycocyanin- H7	APC-H7	785	Infrarot
Violet-Laser	405	Pacific Blue	Pacific Blue	455	Blau

Tabelle 9. Fluorochrom-Referenztable mit Laser und verwendeten Farbstoffen (126).

Wir haben im Abschnitt der Materialien aufgeführte Antikörper verwendet, um CD3⁺-und CD4⁺-Zellen sowie die jeweilige Zytokinproduktion (IFN- γ , IL-4 und IL-17) und Foxp3 quantifizieren zu können. Gemessen wurde die Anzahl an Zellen, die für eines oder mehrere dieser Merkmale positiv waren, pro 50.000 Lymphozyten. Als positiv gewertet wurden Zellen, die nach Kompensation (s. u.) ein stärkeres Fluoreszenzsignal aufwiesen als die entsprechenden Isotypkontrollen.

Vor Beginn der Messung erfolgte die Kompensation, deren Notwendigkeit folgend erklärt wird.

Es werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet, deren Signale durch Farbfilter getrennt in den verschiedenen Detektoren gemessen werden. Da die meisten Fluoreszenzfarbstoffe nicht streng eine Farbe ausstrahlen, sondern ein ganzes Spektrum, gelangt das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal bzw. Detektor sondern verursacht auch in den anderen Kanälen einen schwächeren Impuls. Dies beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse, da man bei Mehrfarbanalysen nicht mehr weiß, welcher Farbstoff das Signal des Detektors verursacht hat. Entsprechend müssen die Detektoren so angepasst werden, dass bei jedem Messsignal der Emissionsanteil aus den anderen Kanälen abgezogen (kompensiert) wird (63).

Für die Kompensation wurden vor Beginn jeder Messung für alle verwendeten Farben 1µl Antikörper-Lösung (bei Konjugaten, ansonsten Isotypen) und ein Tropfen der CompBeads Lösung vermischt und zur Entfernung nicht gebundener Antikörper mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Kompensation von der Diva Software berechnet.

2.2.15 Statistische Auswertung der ermittelten Zytokinwerte

Zur statistischen Auswertung wurden zunächst statistische Maßzahlen ermittelt, wie Mittelwert, Median, 25., 50. und 75. Perzentile sowie die Standardabweichung. Aufgrund der geringen Fallzahlen und wegen der Abweichungen von der Normalverteilung wurden jedoch ausschließlich nichtparametrische Testverfahren und dazu die Maßzahlen Median und 25%-75% Quartile eingesetzt. Der Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Mit diesem parameterfreien statistischen Test wird verglichen, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten bzw. nicht normalverteilten Variablen unterscheiden (64). Während dieser Test für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann, testet man bei zwei Gruppen die Unterschiedlichkeit mit dem Mann-Whitney-U-Test. Mithilfe des letztgenannten Tests wurden anschließend jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen, um hinsichtlich der einzelnen Untersuchungsparameter den Effekt der Operation, den der Infektion und den Alkoholeffekt darstellen zu können. Als signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 betrachtet (65, 66). Wegen des explorativen Charakters dieser Auswertung verstehen sich die erzielten p-Werte nicht als konfirmativ (d.h. die Ergebnisse sind nicht verallgemeinerungsfähig). Aus diesem Grunde wurde auch auf eine multiple Adjustierung der α -Fehler verzichtet.

Zu vergleichende Gruppen

Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48
Kombinierter Effekt von Alkoholbehandlung und Infektion	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48

Tabelle 10. Statistisch zu vergleichende Gruppen.

2.2.16 Statistische Auswertung der Gewichte und des Clinical scores

Auch hier wurden die oben aufgeführten Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U angewendet. Da wir auch die Gewichtsentwicklung und den Verlauf des Clinical Scores der einzelnen Gruppen beurteilen wollten und es nun um den Vergleich zweier voneinander abhängender Stichproben ging, bedienten wir uns des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Dieser nichtparametrische Test prüft anhand zweier gepaarter Stichproben die Gleichheit der zentralen Tendenzen der zugrundeliegenden Grundgesamtheiten. Dabei wird nicht nur die Richtung der Differenzen, sondern auch die Höhe der Differenzen zwischen zwei gepaarten Stichproben berücksichtigt (67).

3. ERGEBNISSE

Um den Einfluss von Ethanol auf die postoperative Immunantwort nach Infektion mit *K. pneumoniae* zu untersuchen, wurden Körpergewicht, klinisches Erscheinungsbild und die T-Zell-Subpopulationen T_H1 , T_H2 , T_H17 und T_{reg} untersucht. Aus ethischen Gründen wurde darauf verzichtet, die Mortalität zwischen den verschiedenen Gruppen zu vergleichen.

3.1 Körpergewicht der Versuchstiere

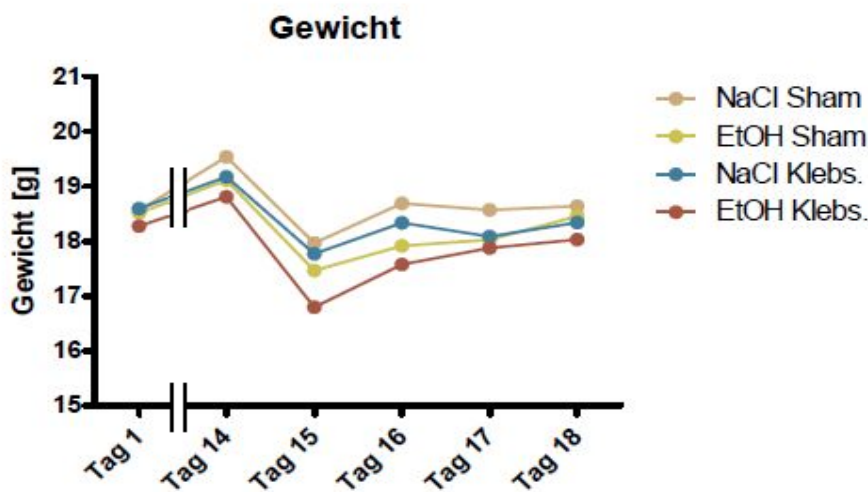


Abbildung 2: Gewichtsverlaufskurve

Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich erhoben. Schließlich wurde es an relevanten Tagen zwischen den Gruppen verglichen. Für uns relevant war das Ausgangsgewicht, das Gewicht am Tag der Operation und an den anschließenden Tagen bis zur Tötung der Tiere. Der Gewichtsverlauf wurde graphisch dargestellt, wobei die 24- und 48-Stunden-Gruppen derselben Behandlungsgruppe bis Tag 18 zusammengefasst wurden (Abb. 2).

Die signifikanten p-Werte der Vergleiche wurden anhand des Kruskal-Wallis-Testes und des Mann-Whitney-U-Testes aufgeführt. Hier wurden ebenfalls die 24- und 48-Stunden-Gruppen derselben Behandlungsgruppe bis Tag 18 zusammengefasst (Tab. 11).

Tag	Kruskal-Wallis-Test	Gruppe	Mann-Whitney-U-Test
1	0,48	NaCl Klebs: EtOH Klebs	0,13
14	0,27	NaCl Klebs: EtOH Klebs	0,20
15	0,03	NaCl Sham: EtOH Klebs	<0,01
		NaCl Klebs: EtOH Klebs	0,03
		NaCl Sham: EtOH Sham	0,16
16	0,03	NaCl Sham: EtOH Klebs	0,01
		NaCl Sham: EtOH Sham	0,03
		NaCl Sham: NaCl Klebs	0,35
		NaCl Klebs: EtOH Klebs	0,11
17	0,38	NaCl Sham: EtOH Klebs	0,08
		NaCl Klebs: EtOH Klebs	0,66

Tabelle 11. Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test der Gewichte nach Tagen. p-Werte der Vergleiche der Gewichte unterschiedlicher Gruppen an bestimmten Tagen. Die signifikanten p-Werte wurden hervorgehoben.

Es fand sich an Tag 15 eine signifikante Verminderung der Gewichtes bei der EtOH Klebs-Gruppe sowohl gegenüber der NaCl Sham-Gruppe ($p=0,00$), als auch gegenüber der NaCl Klebs-Gruppe ($p=0,03$). An Tag 16 waren die Gewichte der NaCl Sham-Gruppe signifikant höher als die der Gruppen EtOH Klebs ($p=0,01$) sowie EtOH Sham ($p=0,03$). Da die Infektion erst am 16. Untersuchungstag (nach der Erhebung des Gewichtes) erfolgte, muss in den aufgeführten Fällen die Gewichtsänderung durch den präoperativen Alkohol bedingt sein. Nach der Infektion wurden keine signifikanten Veränderungen des Gewichtes zwischen den Sham-Gruppen und den Klebs-Gruppen erhoben.

<u>Zu vergleichende Tage</u>	<u>NaCl Sham</u>	<u>EtOH Sham</u>	<u>NaCl Klebs</u>	<u>EtOH Klebs</u>
1-14	< 0.01	0.03	<0.01	0.02
1-15	0.04	<0.01	0.04	< 0.01
1-16	0.30	0.02	0.44	0.03

1-17	0.75	0.11	<0.05	0.08
1-18	0.94	0.44	0.61	0.89
14-15	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
14-16	< 0.01	< 0.01	<0.01	< 0.01
14-17	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
14-18	0.02	0.02	0.06	0.02
15-16	< 0.01	0.02	0.03	0.01
16-17	0.44	0.13	0.04	0.02
17-18	0.45	0.06	0.27	0.36

Tabelle 12. Wilcoxon-Test der Gewichte nach Gruppen. p-Werte der Vergleiche zweier Gewichte innerhalb derselben Gruppe an zwei unterschiedlichen Tagen. Die signifikanten p-Werte wurden fett hervorgehoben. Die 24- und 48- Stunden-Gruppen wurden zusammenfasst.

Der Vergleich der Gewichte innerhalb einer Behandlungsgruppe an unterschiedlichen Tagen erfolgte anhand der Testung nach Wilcoxon (Tab. 12). Präoperativ nahmen alle Mäuse unabhängig von der Ethanolbehandlung zu, ohne dass die intraperitoneale Applikation von Ethanol zu einer signifikanten Gewichtszunahme führte. Wichtig ist hier, dass es sich um wachsende Tiere handelt, also ist die Gewichtszunahme ein normales Geschehen. Der operative Eingriff führte bei allen Tieren zu einer signifikanten Gewichtsabnahme. Am Folgetag, also von Tag 15 zu 16, nahmen wieder alle Gruppen signifikant zu, entsprechend setzte die postoperative Erholung ein. Ab dem 16. Tag kam es nach der Infektion mit *K. pneumoniae* zu divergenten Entwicklungen: Bei den beiden nicht mit *K. pneumoniae* infizierten Versuchsgruppen, kam es zu keinen weiteren signifikanten Gewichtsänderungen. Dem gegenüber führte die Infektion mit *K. pneumoniae* in der alkoholexponierten Gruppe (EtOH Klebs) zu einer Gewichtszunahme, während die entsprechende Kontrollgruppe (NaCl Klebs) signifikant an Gewicht verlor. Zusammenfassend erreichten vier Tage postoperativ alle Tiere verglichen mit dem präoperativen Ausgangswert, ihr Gewicht nicht wieder. Allerdings verfehlte der Gewichtsunterschied der NaCl Klebs-Gruppe das Signifikanzniveau knapp.

3.2 Clinical Score (CS)

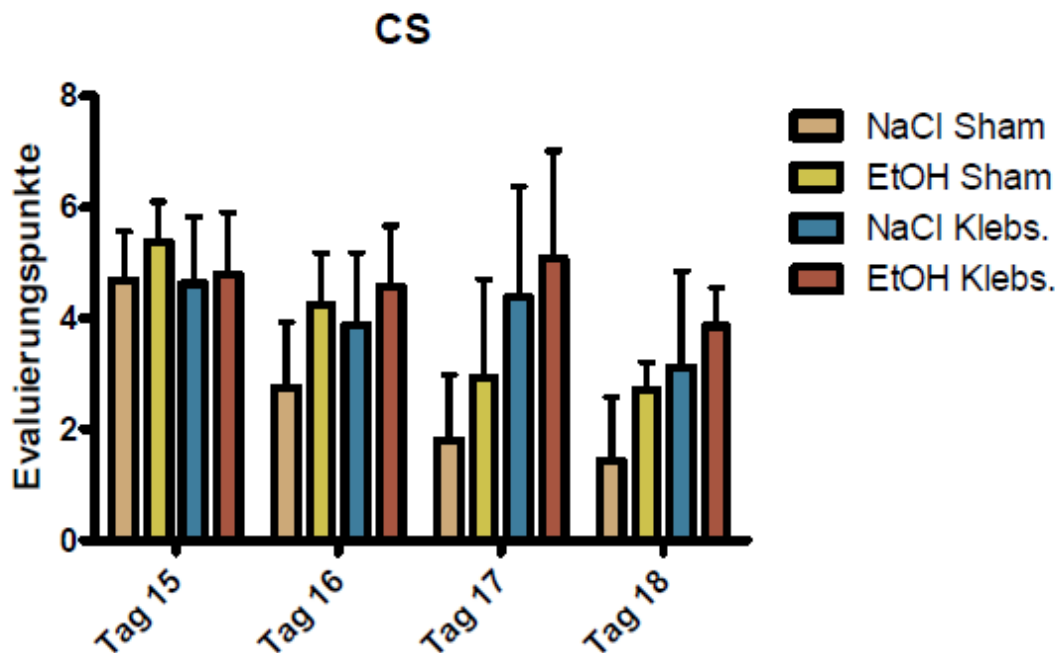


Abbildung 3. Clinical Score (CS) an den Tagen 15 bis 18. Die 24- und 48-Stunden-Gruppen wurden zusammengefasst.

Gruppe		Tag 15	Tag 16	Tag 17	Tag 18
Alkoholeffekt	NaCl Sham: EtOH Sham	0.03	<0.01	0.09	<0.01
	NaCl Klebs: EtOH Klebs:	0.76	0.10	0.14	0.36
Infektionseffekt	EtOH Sham: EtOH Klebs	-	-	0.01	0.01
	NaCl Sham: NaCl Klebs	-	-	< 0.01	0.04
Kombinierter Effekt	NaCl Sham: EtOH Klebs	-	-	< 0.01	<0.01

Tabelle 13. Mann-Whitney-U-Test des Clinical Scores nach Tagen. Die signifikanten p-Werte wurden fett hervorgehoben. Die 24- und 48-Stunden-Gruppen wurden zusammengefasst. Da erst am 16. Untersuchungstag die Infektion erfolgte, ist erst ab dem 17. Untersuchungstag eine Aussage über den Infektionseffekt und der Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion zu erheben.

Während die Gewichtsentwicklung nur ein grober Anhalt für den postoperativen Verlauf darstellt, erlaubt der klinische Score (s. Material und Methoden) eine sehr viel dezidiere Beurteilung über das Befinden der Mäuse. Der CS wurde täglich erhoben und dokumentiert.

Hierbei wurden die 24- und 48-Stunden-Gruppen bis auf den letzten Tag zusammengefasst. Schließlich wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests signifikante Unterschiede des CS in den Untersuchungsgruppen berechnet.

Der Alkoholeffekt bewirkte beim Vergleich der NaCl Sham-Gruppe mit der EtOH Sham-Gruppe eine signifikante Verschlechterung des klinischen Befindens (also eine Erhöhung des CS) an den Untersuchungstagen 15 ($p=0,03$), 16 ($p<0,01$) und 18 ($p<0,01$).

Bei Betrachtung des Infektionseffektes wurde diese signifikante Verschlechterung des klinischen Erscheinungsbildes in der EtOH Klebs-Gruppe gegenüber der EtOH Sham-Gruppe an den Tagen 17 und 18 nachgewiesen (jeweils $p=0,01$). Auch bei der NaCl Klebs-Gruppe fand sich verglichen mit der NaCl Sham-Gruppe an den Untersuchungstagen 17 ($p<0,01$) und 18 ($p=0,04$) dieser klinisch sichtbare Verfall.

Die Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion führte an den Tagen 17 bis 18 zu einer signifikanten Verschlechterung des klinischen Zustandes, wie aus der Gegenüberstellung der NaCl Sham-Gruppe mit der EtOH Klebs-Gruppe (jeweils $p<0,01$) ablesbar wird (Abb. 3, Tab. 13).

<u>Zu vergleichende Tage</u>	<u>NaCl Sham</u>	<u>EtOH Sham</u>	<u>NaCl Klebs</u>	<u>EtOH Klebs</u>
14-17	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
14-18	0.04	0.01	0.01	0.02
15-16	<0.01	<0.01	<0.01	0.46
15-17	<0.01	<0.01	0.57	0.74
15-18	0.01	0.01	0.02	0.07
16-17	<0.01	<0.01	0.33	0.39
17-18	0.35	0.83	0.42	0.50

Tabelle 14. Wilcoxon-Test des CS nach Gruppen. p-Werte der Vergleiche der CS derselben Gruppe an zwei unterschiedlichen Tagen. Die signifikanten p-Werte wurden fett hervorgehoben.

Von Tag 15 zu Tag 16 sind die CS der Gruppen NaCl Sham, EtOH Sham und NaCl Klebs signifikant gesunken. Von Tag 15 zu Tag 17 sind die CS der Gruppen NaCl Sham und EtOH Sham signifikant gesunken. An Tag 18 waren die CS der Gruppen NaCl Klebs, EtOH Sham und NaCl Sham signifikant niedriger als am Tag 15. Von Tag 16 zu 17 sank der CS bei den Gruppen NaCl Sham und EtOH Sham. Diese Ergebnisse wurden anhand des Wilcoxon-Tests

(Tab. 14) berechnet. Zusammenfassend lassen sich hinsichtlich des klinischen Verlaufes der untersuchten Tiere folgende Aussagen treffen: Die Kontrollmäuse erholten sich nach der Operation. Nach Alkoholbehandlung oder Infektion mit *K. pneumoniae* erholten sich die Tiere langsamer. Nach kombinierter Behandlung (Alkohol und *K. pneumoniae*) erholten sich die Mäuse nicht. Die Gewichtsveränderung allein erlaubt keine ausreichende Aussage über das klinische Befinden. Um zu untersuchen inwiefern die adaptive Immunantwort für diese Aussagen verantwortlich ist, wurde wie nachfolgend aufgeführt die Zusammensetzung der Effektor-T-Zell-Subpopulationen zytometrisch untersucht.

3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung

Es folgt die Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchung von Lunge und Milz, die bei allen oben aufgeführten Versuchsgruppen (1-12) durchgeführt wurden. Für die Ermittlung dieser Daten wurden aus dem im FACS-Streudiagramm manuell gesetzten Lymphozyten-Gate die Populationen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bestimmt (Abb.4).

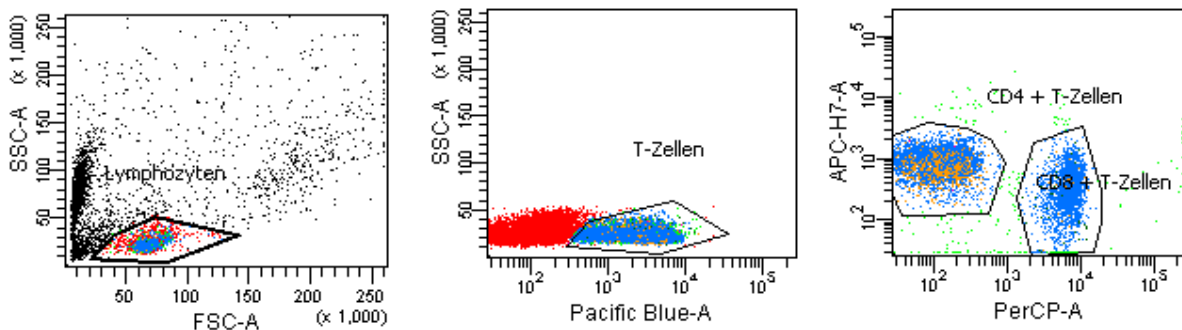


Abbildung 4. Exemplarische Darstellung manuell gesetzter Gates mittels Dotplot-Grafiken. Links: Darstellung des Lymphozyten-Gates im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Diagramm. Mitte: Detektion der T-Zellen. Rechts: Darstellung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulation.

Aus den gesetzten Gates der CD4⁺ Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch Foxp3, IFN- γ , IL-4 und IL-17 exprimierende T-Zellen bestimmt (Abb. 5). Im Folgenden werden Ergebnisse immer als Anzahl der entsprechenden Zellen pro 50000 Lymphozyten angegeben.

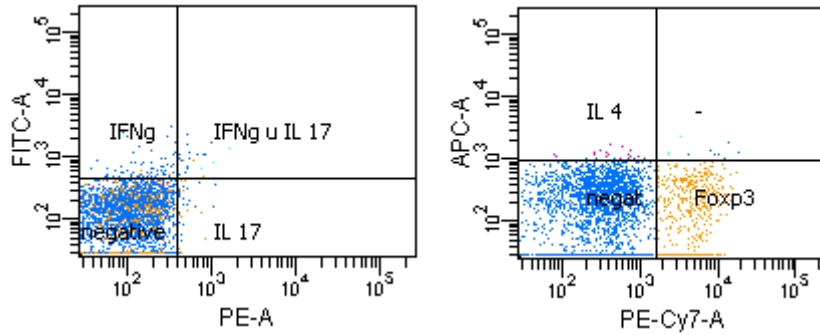


Abbildung 5. Exemplarische Dotplot-Diagramme einer Messung von intrazellulären Zytokinen bzw. FoxP3. Links: IFN- γ (FITC, y-Achse) exprimierende und IL-17 (PE, x-Achse) exprimierende CD3⁺CD4⁺-Zellen. Rechts: IL-4 (APC, y-Achse) und Foxp3 (PE-Cy7, x-Achse) exprimierende sezernierende CD3⁺CD4⁺-Zellen. Die Quadranten wurden bei jedem Experiment so gesetzt, dass >99,99% der jeweiligen Isotyp-Kontrollen im linken unteren Quadranten detektiert wurden. Als für ein Merkmal positiv wurden Zellen gewertet, wenn sie im entsprechenden Quadranten detektiert wurden.

Für jede Gruppe wurde mittels des Statistikprogramms SPSS Median und Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden die Gruppen miteinander verglichen. Zunächst wurde zur Varianzanalyse für jede untersuchte Zellensubpopulation der **Kruskal-Wallis-Test** durchgeführt. Dieser kann – wie schon im Methodenkapitel erörtert - für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden (Tab. 15).

Nachdem ermittelt war, ob sich die verschiedenen unabhängigen Stichproben (Untersuchungsgruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable (Subpopulation der T-Zellen) unterscheiden, wurde der **Mann-Whitney-U-Test** angewandt. Hiermit wurden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen, um hinsichtlich der einzelnen Untersuchungsparameter den Alkoholeffekt, den Effekt der Infektion sowie durch den Zeitvergleich einen Effekt der Operation darstellen zu können. Als signifikant wurden **p-Werte** kleiner 0,05 betrachtet.

Organ	Subpopulation	Kruskal-Wallis-Test	
		Signifikanz	p-Wert
Lunge	T-Zellen	+	0,00
	CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00
	Foxp3 exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00
	IFN- γ exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00
	IL-4 exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	-	0,27
	IL-17 exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	<0,01
Milz	T-Zellen	+	< 0,1
	CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,03

Foxp3 exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00
IFN- γ exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00
IL-4 exprimierende CD4 ⁺ -T-Zellen	+	0,00

Tabelle 15. Varianzanalyse mittels **Kruskal-Wallis-Test**. Darstellung der Unterscheidung verschiedener unabhängiger Stichproben (Untersuchungsgruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variablen (T-Zell-Subpopulation).

Wegen des großen Umfangs der Messergebnisse werden hier die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile der Messungen der CD3⁺-T-Zellen in der Lunge für die einzelnen Versuchsgruppen nur einmalig tabellarisch wiedergegeben (Tab. 16). Zur besseren Übersichtlichkeit werden diese Werte in den folgenden Kapiteln graphisch mittels Boxblots wiedergegeben.

Gruppe	Median	25. Perzentile	75. Perzentile	Anzahl der Tiere
NaCl Sham 24	18632,50	17000,00	21868,25	8
EtOH Sham 24	19879,50	17397,25	24068,00	8
NaCl Klebs 24	25164,00	21313,50	28925,50	8
EtOH Klebs 24	25983,0	22987,00	27137,00	7
NaCl Sham 48	19785,00	17906,00	20006,00	7
EtOH Sham 48	23925,50	21811,00	27518,00	8
NaCl Klebs 48	23763,00	22517,75	28077,00	8
EtOH Klebs 48	22584,00	19913,00	23832,00	7

Tabelle 16. Exemplarische Auflistung des Median, der 25. sowie der 75. Perzentile der gemessenen CD3⁺ T-Zellen (je 50000 Lymphozyten) sowie der Anzahl der Tiere in den jeweiligen Versuchsgruppen.

3.3.1. FACS-Analyse der Lunge

3.3.1.1 T-Zellen in der Lunge

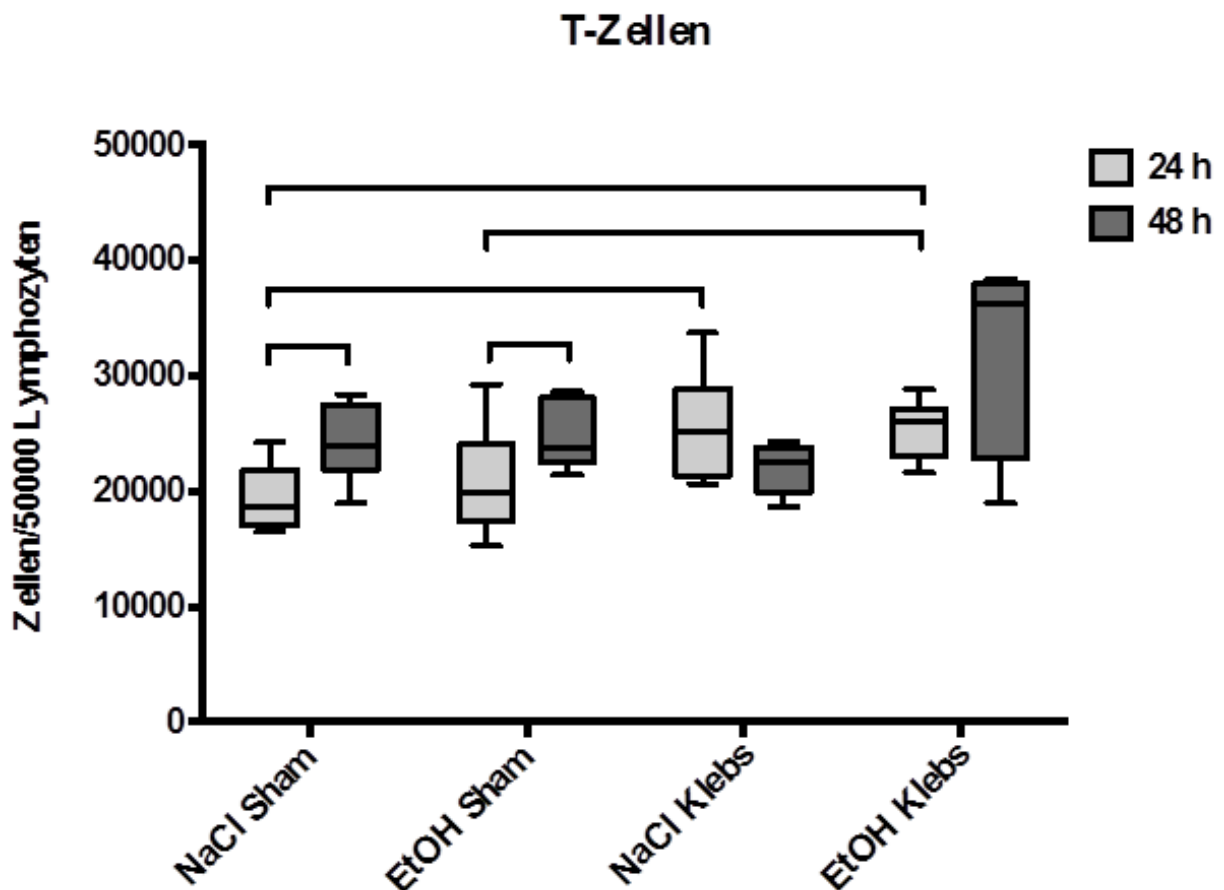


Abbildung 6. T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit CD3-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Präoperative Alkoholbehandlung führte nach 24 und nach 48 Stunden weder bei postoperativ mit *K. pneumoniae* infizierten noch bei Sham-infizierten Tieren in der Lunge zu signifikanten Veränderungen der T-Zellzahlen. Die Infektion mit *K. pneumoniae* führte allerdings – unabhängig von der präoperativen Alkoholexposition – schon nach 24 h zu einer signifikanten Zellzahlerhöhung der T-Zellen ($p=0,03$ in EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24; $p<0,01$ in NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24, Abb. 6, Tab. 17), als kombinierter Effekt von Alkohol-Exposition

und *K. pneumoniae*-Infektion ebenfalls ($p < 0,01$ in NaCl Sham: EtOH Klebs, Abb. 6, Tab. 17). Der Effekt war transient, da am 48 h Zeitpunkt die Anzahl der T-Zellen in den Sham-Gruppen im Vergleich zu dem 24 h Messwert signifikant erhöht war ($p < 0,05$ in EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48, $p = 0,01$ in NaCl Sham 24 : NaCl Sham; Abb. 6, Tab. 17).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,70
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,74
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,85
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,05
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	**	<0,01
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,19
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	*	0,03
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,23
Kombinierter Effekt von Alkoholbehandlung und Infektion	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	**	<0,01
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,28
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	*	0,01
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	*	<0,05
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,13
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,45

Tabelle 17. T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. $p > 0,05$ = nicht signifikant (n.s.). Zur verbesserten Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzniveaus wie folgt markiert: $p \leq 0,0001$ (***) , $p \leq 0,001$ (**) und $p \leq 0,01$ (*) (Mann-Whitney-U-Test).

3.3.1.2 CD4⁺ T-Zellen in der Lunge

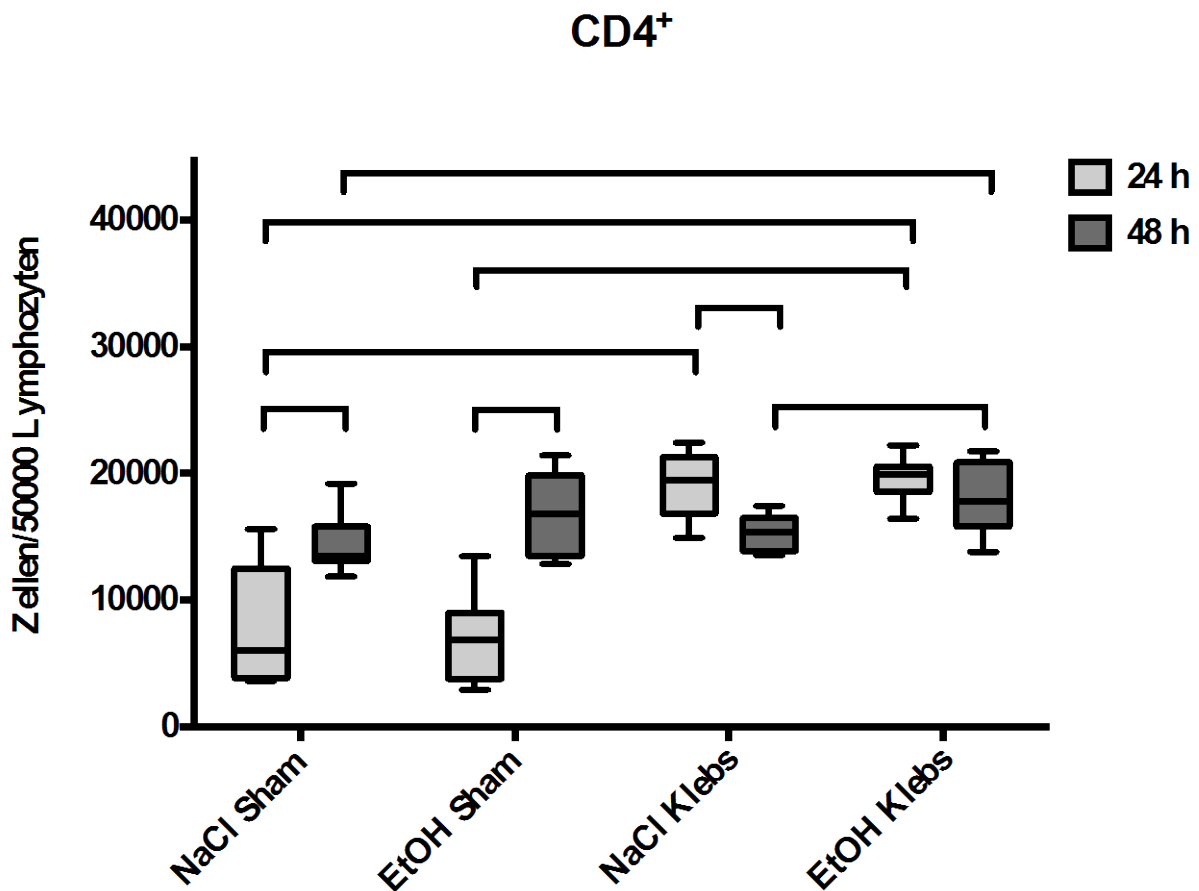


Abbildung 7. CD4⁺T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit CD4-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Wie bei den Gesamt-T-Zellen war der Effekt einer präoperativen Alkoholexposition auf die Anzahl aller pulmonaler CD4⁺ T-Zellen nach Laparotomie und *K. pneumoniae*- bzw. Sham-Infektion moderat. Lediglich 48 h nach der Infektion mit *K. pneumoniae* kam es zu einer signifikanten ($p=0,04$ in NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48, Abb. 7 u. Tab. 18) Vermehrung im Vergleich zur nicht-alkoholexponierten Kontrollgruppe.

Die Zunahme der CD4⁺ T-Zellen 24 h nach *K. pneumoniae*-Infektion im Vergleich zur Sham-Infektion war noch deutlicher als bei den Gesamt T-Zellen (jeweils $p < 0,0001$ in NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24 und EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24; Abb. 7 u. Tab. 18).

Unter dem kombinierten Effekt von Alkoholbehandlung und Infektion kam es bei beiden Untersuchungszeitpunkten zu einer signifikanten Zunahme der pulmonalen CD4⁺ T-Zellen (p<0,0001 in NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24 und p=0,02 in NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48; Abb. 7 u. Tab. 18).

Im zeitlichen Verlauf nach einer Scheininfektion kam es zu einer Erhöhung der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge (p>0,0001 in EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48, p=0,03 in NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48, Abb. 7 und Tab. 18), während sie nach einer *K. pneumoniae*-Infektion ohne Alkoholbehandlung wieder abnahm (p<0,001 in NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48; Abb. 7 und Tab. 18). Nach *K. pneumoniae*-Infektion mit Alkoholbehandlung blieben die CD4⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf konstant (p=0,27 in EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48, Abb. 7 u. Tab. 18).

Zu vergleichende Gruppen	Signifikanz	p-Wert	
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,63
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,16
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,93
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	*	0,04
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	***	<0,0001
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,16
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	***	<0,0001
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,33
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	***	<0,0001
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	*	0,02
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	*	0,03
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	***	<0,0001
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	**	<0,001
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,27

Tabelle 18. CD4⁺ T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.1.3 IFN- γ exprimierende CD4⁺T-Zellen in der Lunge

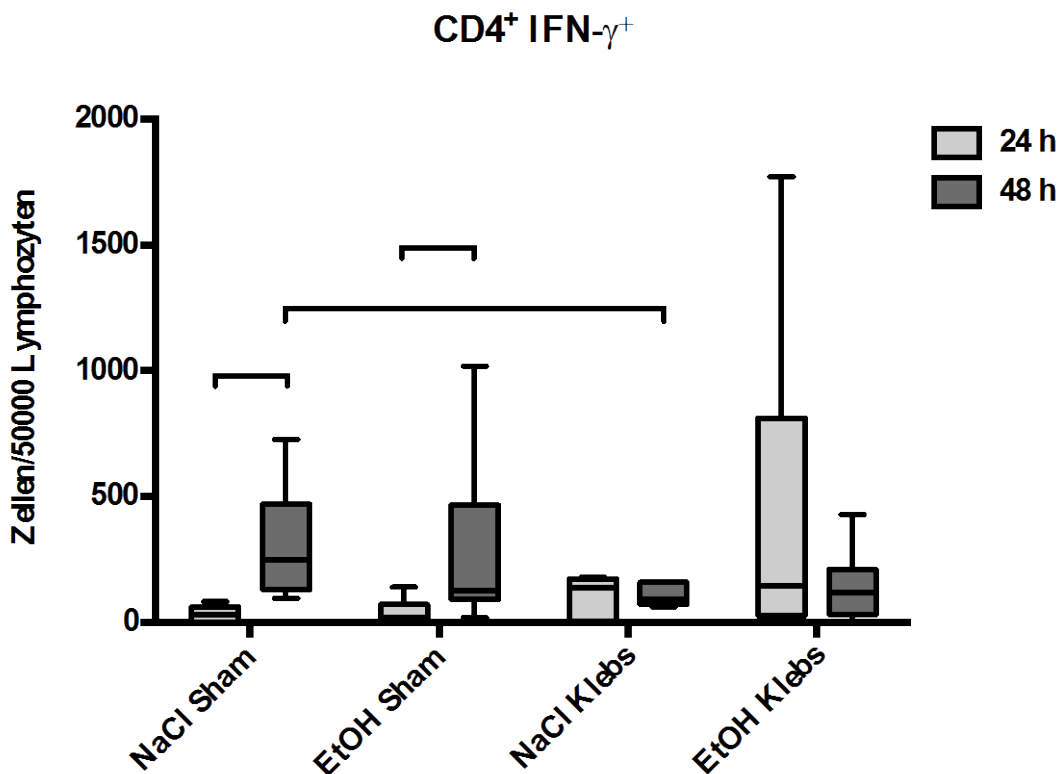


Abbildung 8. IFN- γ exprimierende CD4⁺T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit CD4-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

48 Stunden nach *K. pneumoniae*-Infektion zeigten sich signifikant weniger IFN- γ produzierende CD4⁺-T-Zellen bei NaCl-behandelten Tieren als in der Sham-Gruppe ($p < 0,001$ in NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48; Abb. 8 und Tab. 19).

Im zeitlichen Verlauf gab es in den Sham-Gruppen unabhängig von einer Alkoholbehandlung eine signifikante Vermehrung von IFN- γ produzierenden CD4⁺-T-Zellen ($p < 0,0001$ in NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48 und $p = 0,01$ in EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48; Abb. 8 und Tab. 19).

Nach *K. pneumoniae*-Infektion unabhängig von der Ethanolexposition gab es keine Veränderung von IFN- γ produzierenden CD4⁺-T-Zellen im zeitlichen postoperativen Verlauf (NaCl Klebs 24: NaCl 48 und EtOH Klebs 24: EtOH Klebs 48 jeweils n.s.; Abb. 8 und Tab. 19).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,80
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,50
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,38
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,60
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,15
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	**	<0,001
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,07
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,52
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,09
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,12
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	***	<0,0001
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	*	0,01
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,94
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,69

Tabelle 19. IFN- γ exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IFN- γ exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.1.4 IL-4 exprimierende CD4⁺-Zellen in der Lunge

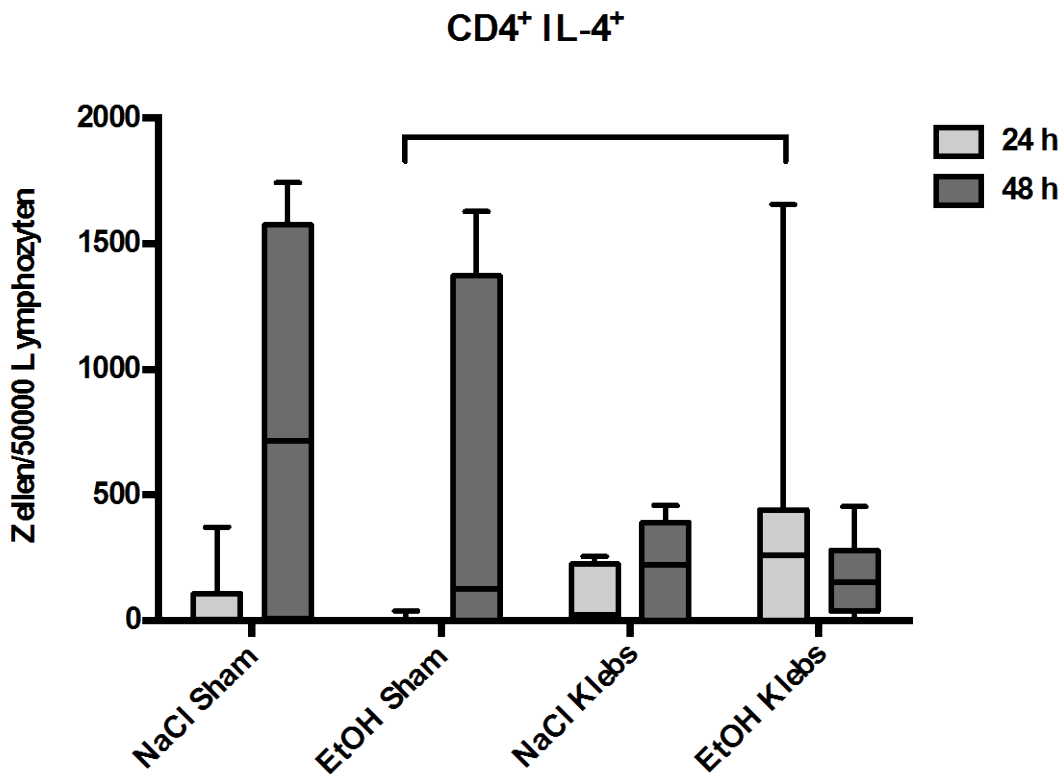


Abbildung 9. IL-4 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit IL-4-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Aufgrund der großen Streuung und der geringen absoluten Anzahl an IL-4-produzierenden CD4⁺-T-Zellen konnte weder ein statistisch signifikanter Einfluss von präoperativer Alkohol-Exposition noch eine eindeutige zeitliche Entwicklung der T_H2-Zellzahl gezeigt werden.

Allerdings ging die transiente Vermehrung der CD4⁺-T-Zellen 24 h nach der *K. pneumoniae*-Infektion (s. o.) mit einer transienten (nur 24 h post infectionem) aber signifikanten Vermehrung an T_H2-Zellen einher, wenn die Tiere präoperativ mit Alkohol exponiert wurden ($p=0,02$ in EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24; Abb. 9 und Tab. 20).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,06
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,55
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,17
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,88
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	1,0
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,37
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	*	0,02
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	1,0
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,33
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,69
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,19
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,08
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,36
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,90

Tabelle 20. IL-4 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.1.5 IL-17 exprimierende CD4⁺T-Zellen in der Lunge

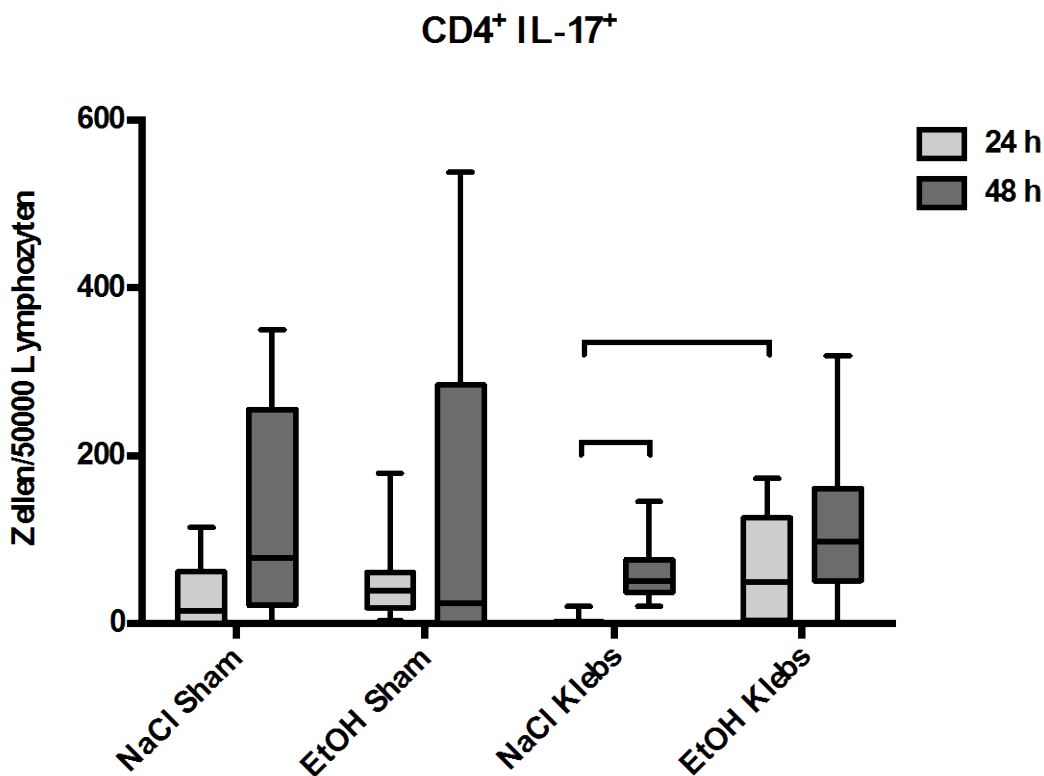


Abbildung 10. IL-17 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit IL-17-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Bei mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren zeigten sich 24 Stunden nach Alkoholbehandlung eine signifikante Zunahme der T_H17-Zellen in der Lunge ($p < 0,001$ in NaCl Kleb 24 : EtOH Klebs 24; Abb. 10 und Tab. 21).

Erwartungsgemäß kam es auch im zeitlichen Verlauf nach einer *K. pneumoniae*-Infektion zur Induktion von T_H17-Zellen in der Lunge ($p < 0,0001$ in NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48; Abb. 10 und Tab. 21). Allerdings war auch hier die Streuung der gemessenen T_H17-Zellzahlen groß und der Anteil an T_H17-Zellen an allen Lymphozyten sehr niedrig. Alkoholbehandelte Tiere zeigten diese Veränderung nicht.

Präoperative Alkoholexposition und/oder postoperative *K. pneumoniae*-Infektion führten zu keinem gemessenen Zeitpunkt zu signifikanten Unterschieden zwischen die einzelnen Gruppen.

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,29
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,52
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	**	<0,001
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,23
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,15
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,38
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,89
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,63
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,19
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	1,00
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,06
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,64
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	***	<0,0001
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,48

Tabelle 21. IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-17 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.1.6 Foxp3 exprimierende CD4⁺-Zellen in der Lunge

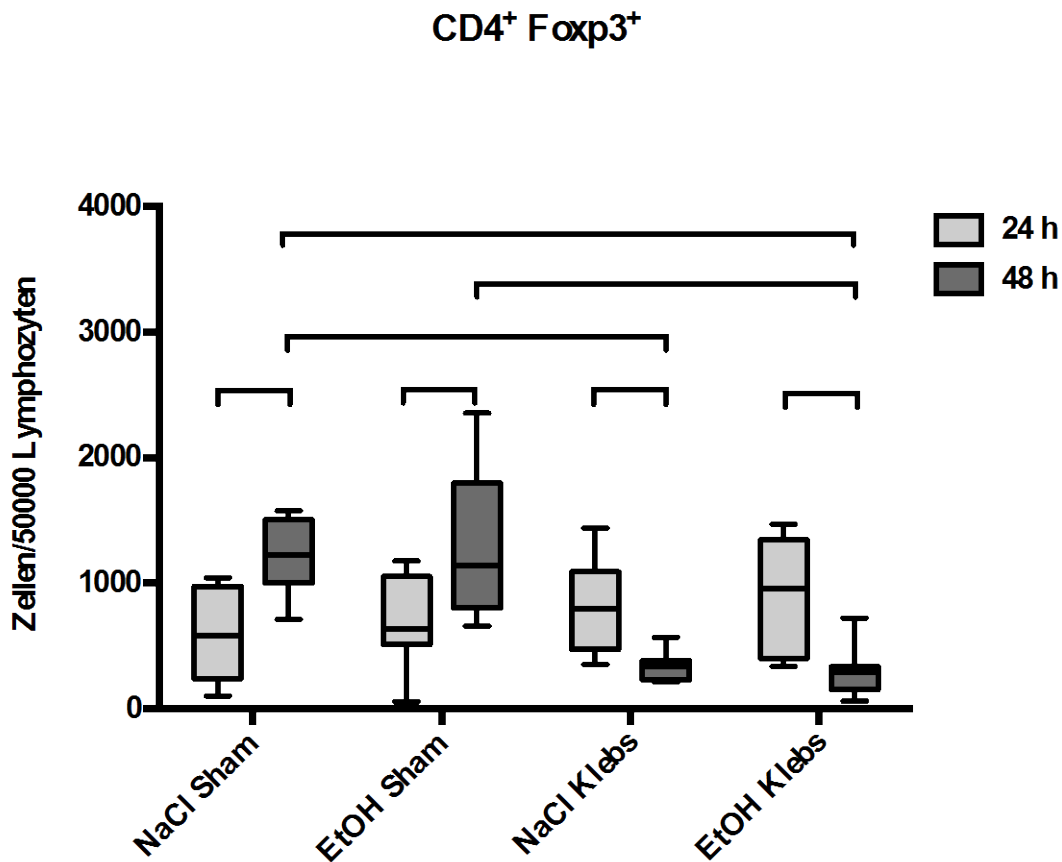


Abbildung 11. Foxp3 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Lunge: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung. exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Lungen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit Foxp3-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Präoperative Alkoholexposition hatte keinen Einfluss auf die Zahl der in der Lunge detektierbaren T_{reg}-Zellen.

Die Auswirkungen einer *K. pneumoniae*-Infektion waren im zeitlichen Verlauf postoperativ erheblich:

Während die Zahl der Foxp3-positiven Zellen von 24 h bis 48 h nach einer Schein-Infektion signifikant stieg, fiel sie im gleichen Zeitraum nach einer *K. pneumoniae*-Infektion (alle zu vergleichenden Gruppen hinsichtlich des Effektes des zeitlichen Verlaufes; Abb. 11 und Tab. 22).

Bei Betrachtung des reinen Infektionseffektes war die Zahl der gemessenen T_{reg}-Zellen 48 Stunden nach *K. pneumoniae*-Infektion im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe hochsignifikant erniedrigt (NaCl Sham 48: NaCl Klebs 48 sowie EtOH Sham 48: EtOH Klebs 48 jeweils p < 0,0001, Abb. 11 und Tab. 22).

Dieser Effekt war nur 48 Stunden nach der Infektion sichtbar, auch bei der kombinierten Alkoholexposition und *K. pneumoniae*-Infektion (NaCl Sham 48: EtOH Klebs 48 p < 0,0001, Abb. 11 und Tab. 22).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,70
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	1,0
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,93
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,39
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,28
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	***	<0,0001
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,68
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	***	<0,0001
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,15
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	***	<0,0001
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	**	<0,001
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	*	0,02
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	**	<0,001
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	**	<0,001

Tabelle 22. Foxp3 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Lunge: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2 FACS-Analyse Milz

3.3.2.1 T-Zellen in der Milz

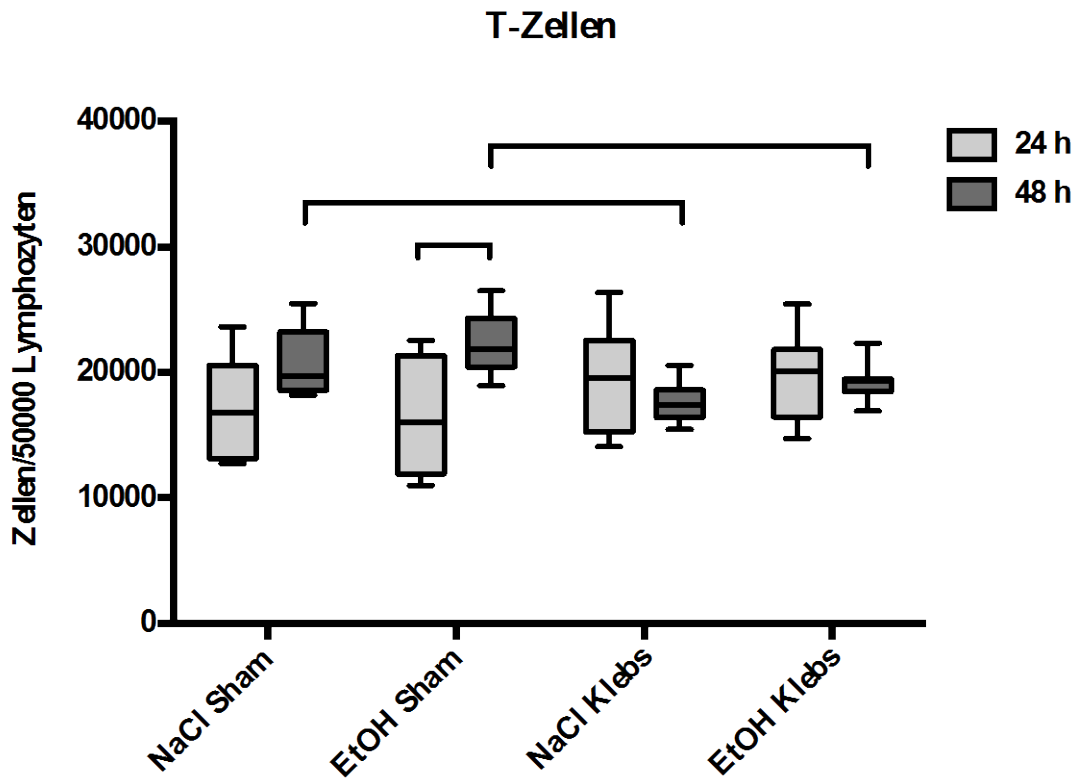


Abbildung 12. T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit CD3-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Wie in der Lunge führte präoperative Alkoholexposition in der Milz nicht zu einer signifikanten T-Zellzahländerung im Vergleich zu den nicht-alkoholexponierten Gruppen. Ebenfalls ähnlich, allerdings nicht so eindeutig, waren die steigenden T-Zellzahlen von 24 bis 48 Stunden nach der Scheininfektion der Lunge ($p=0,02$ bei EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48, Abb. 12 und Tab. 23).

Durch Infektion war nach 48 Stunden die Zellzahl im Vergleich zur Scheinbehandlung sowohl in der Alkohol- und NaCl-Gruppe signifikant erniedrigt ($p=0,01$ in NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48, $p=0,02$ in EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48, Abb. 12 und Tab. 23).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	1,0
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,23
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,93
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,05
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,28
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	*	0,01
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,28
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	*	0,02
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,23
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,39
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,23
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	*	0,02
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,28
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,78

Tabelle 23. T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2.2 CD4⁺ T-Zellen in der Milz

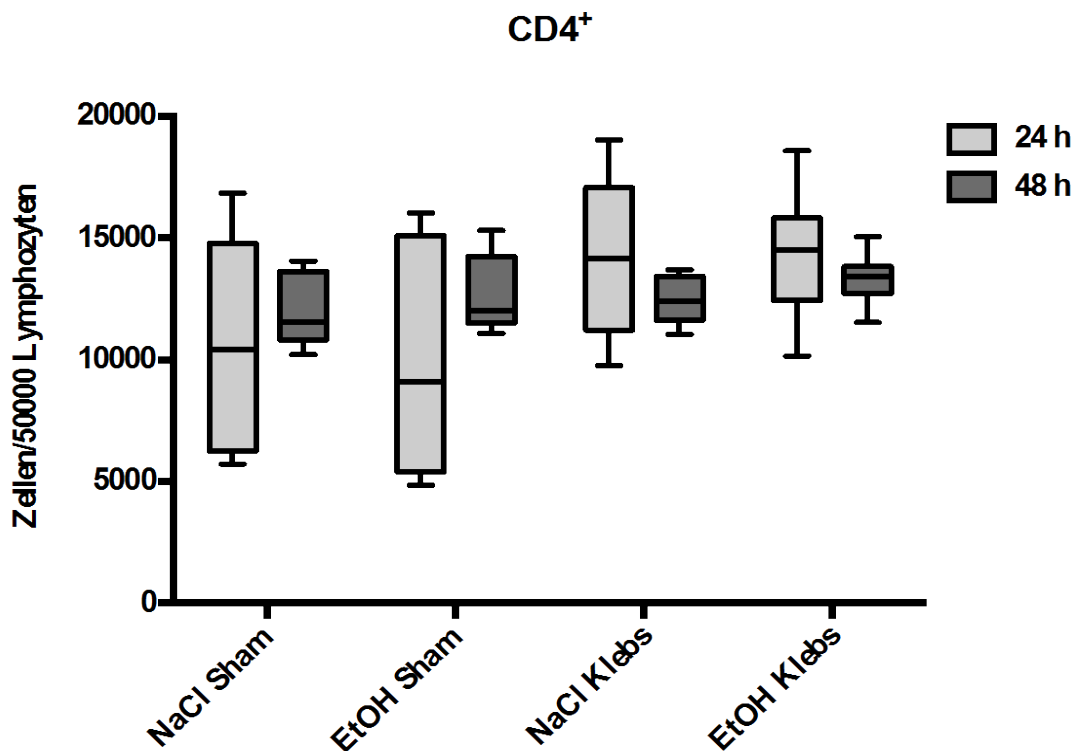


Abbildung 13. CD4⁺ T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit CD4-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum.

Im Gegensatz zu den deutlichen Änderungen der CD4⁺-T-Zellzahlen in der Lunge nach pulmonaler Schein- bzw. *K. pneumoniae*-Infektion (s. o.) ergab sich bei der Untersuchung der CD4⁺ T-Zellen der Milz keine signifikante Unterschiede der CD4⁺-T-Zellzahlen innerhalb der untersuchten Gruppen (Abb. 13, Tab. 24).

Zu vergleichende Gruppen	Signifikanz	p-Wert	
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,56
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,32
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	1,0
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,19
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,16
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,43

	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,12
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,28
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,19
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,19
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,93
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,38
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,16
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,38

Tabelle 24. CD4⁺ T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2.3 IFN- γ exprimierende CD4⁺ T-Zellen in der Milz

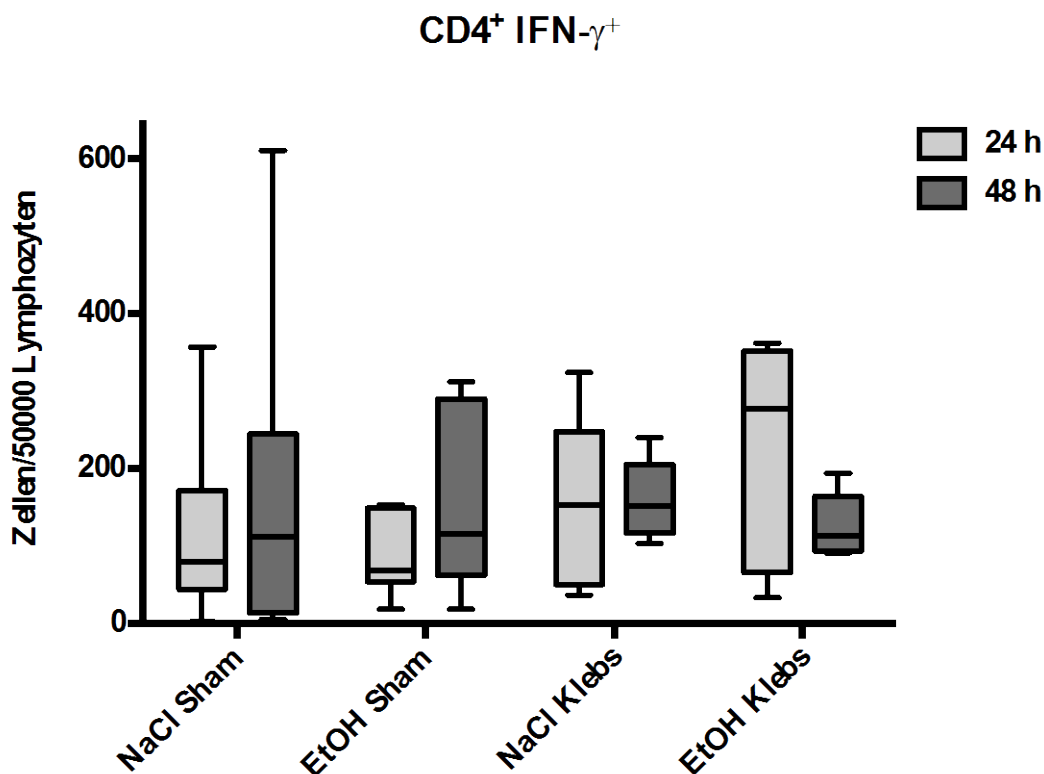


Abbildung 14. IFN- γ exprimierende CD4⁺T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit IFN- γ -spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum.

Es ergeben sich hier keine signifikanten Veränderungen in den getesteten Gruppen (Abb. 14, Tab. 25). Wie in der Lunge waren nur relativ wenige IFN- γ produzierende CD4⁺ T-Zellen nachweisbar und die Streuung innerhalb der untersuchten Gruppen war erheblich.

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,70
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,63
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,39
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,12
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,63
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,56
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,13
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,84
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,33
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,85
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,93
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,40
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,93
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,69

Tabelle 25. IFN- γ exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IFN- γ exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2.4 IL-4 exprimierende CD4⁺ T-Zellen in der Milz

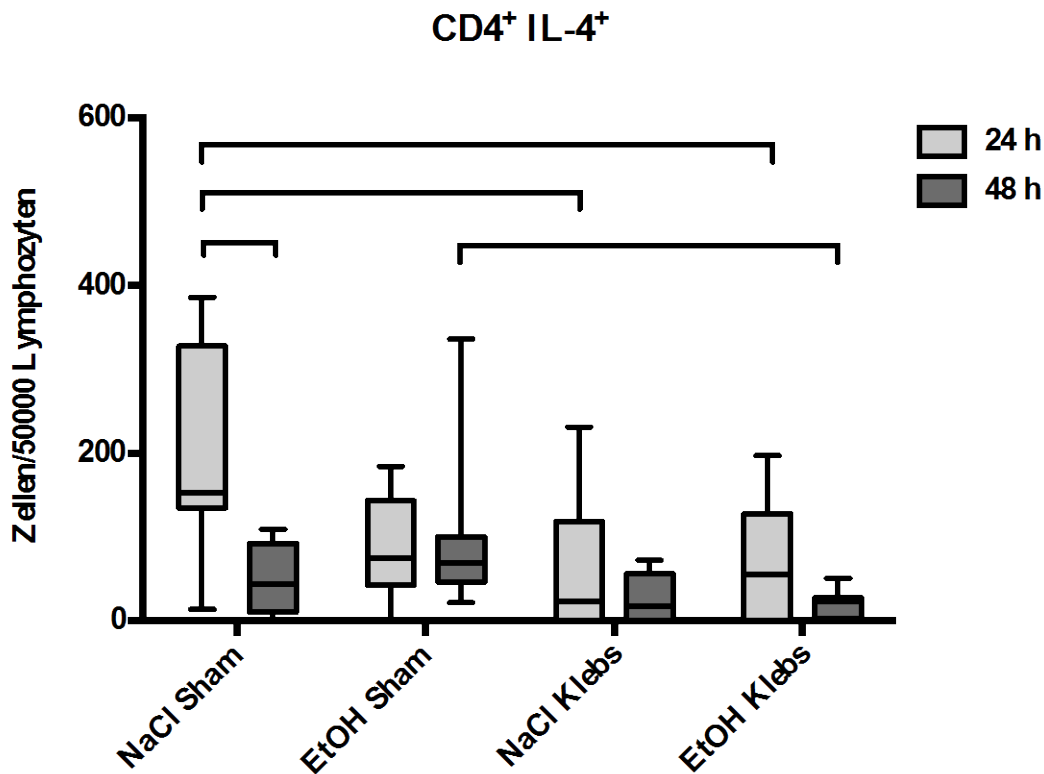


Abbildung 15. IL-4 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit IL-4-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Während die Zahl der IL-4 produzierenden CD4⁺-T-Zellen in der Milz von nicht-alkoholexponierten Tieren von 24 bis 48 Stunden nach der pulmonalen Sham-Infektion signifikant sank ($p < 0,001$ in NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48; Abb. 15 und Tab. 26), war diese zeitliche Entwicklung nach präoperativer Alkoholexposition nicht zu zeigen. Ansonsten gab es keinen messbaren Einfluss von präoperativer Alkoholexposition auf die Zellzahl IL-4 exprimierender T-Zellen in der Milz.

24 Stunden nach pulmonaler *K. pneumoniae*-Infektion waren in der NaCl-Gruppe weniger IL-4 produzierende CD4⁺-T-Zellen in der Milz zu messen (NaCl Sham 24: NaCl Klebs 24, $p = 0,02$). Dagegen waren 48 Stunden nach der Infektion in der alkoholexponierten Gruppe weniger IL-4 produzierende CD4⁺-T-Zellen in der Milz zu messen (EtOH Sham 48: EtOH Klebs 48, $p < 0,001$, Abb. 15 und Tab. 26).

Der kombinierte Effekt von Alkoholexposition und Infektion zeigte nach 24 Stunden ebenfalls eine verminderte Zahl der IL-4 produzierenden CD4⁺-T-Zellen in der Milz (NaCl Sham 24: EtOH Klebs 24, p=0,02, Abb. 15 und Tab. 26).

Betrachten wir nun die aufgezählten Ergebnisse aus dem isoliertem Infektionseffekt und dem kombinierten Effekt aus Alkoholexposition und Infektion, kommen wir zu folgender Aussage: *K. pneumoniae*-Infektion und Alkoholexposition führten 24 Stunden nach der Infektion zu einer Verminderung IL-4 produzierender CD4⁺-T-Zellen in der Milz (NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24, p=0,02; Abb. 15 und Tab. 26), nicht jedoch nach 48 Stunden, da sie postoperativ im zeitlichen Verlauf bereits erniedrigt waren.

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,07
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,20
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,77
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	1,0
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	*	0,02
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,18
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,78
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	**	<0,001
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	*	0,02
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,13
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	**	<0,001
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,88
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,56
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,45

Tabelle 26. IL-4 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2.5 IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen in der Milz

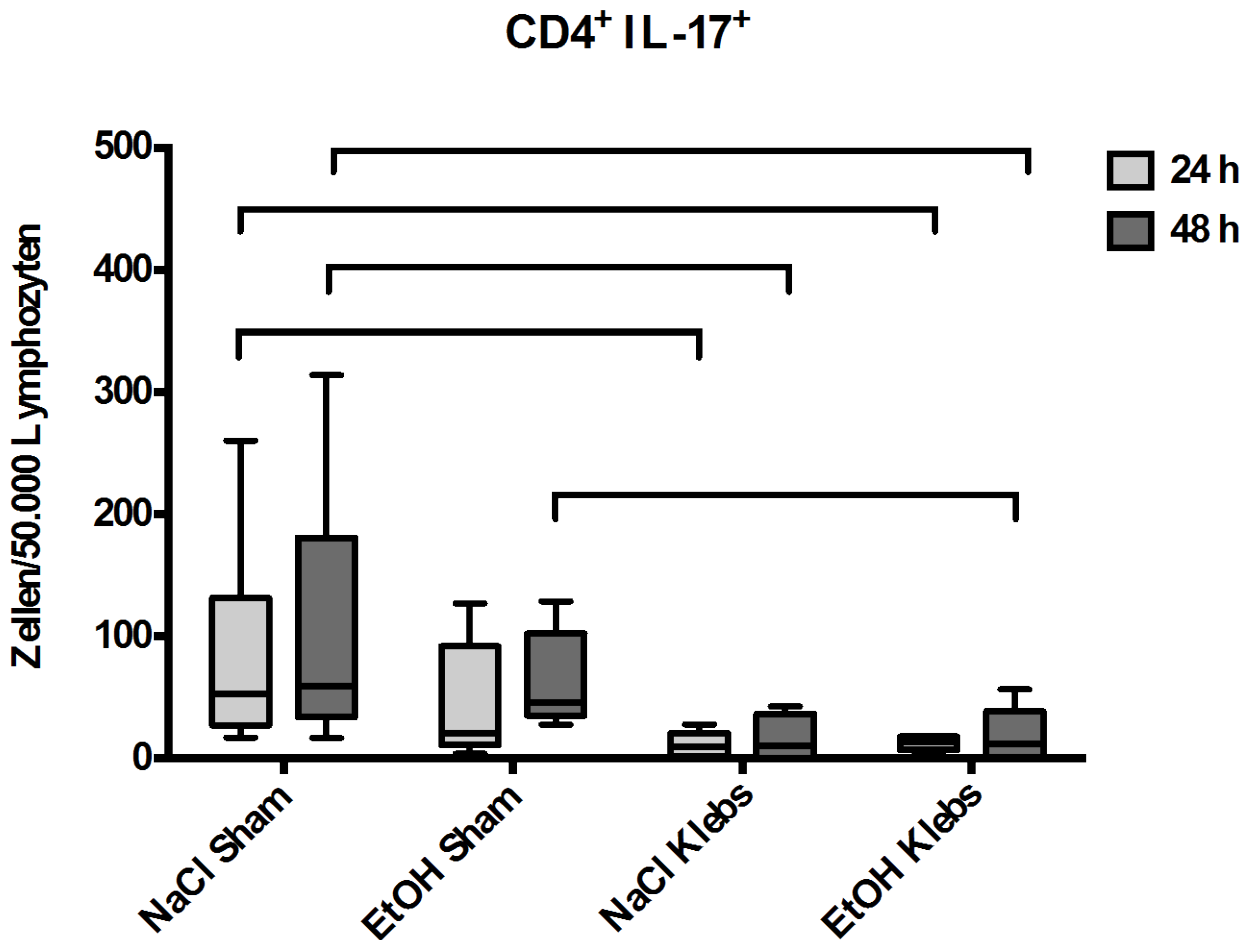


Abbildung 16. IL-17 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit IL-17-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Im Gegensatz zu der Induktion von T_H17-Zellen in der Lunge unter der Infektion (NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48, $p > 0,01$; Abb 10. und Tab. 21) war die T_H17-Zellzahl in der Milz nach pulmonaler *K. pneumoniae*-Infektion reduziert: Der isolierte Infektionseffekt führte bei den nicht-alkoholexponierten Gruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten ($p < 0,0001$ in NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24 sowie $p = 0,02$ in NaCl Sham 48 : NaCl Klebs; s. Abb. 16 und Tab. 27) und bei den alkoholexponierten Gruppen nach 48 Stunden zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-17 exprimierenden T-Zellen (EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48, $p = 0,01$; Abb. 16 und Tab. 27). Lediglich 24 Stunden nach der Sham- bzw. *K. pneumoniae* -Infektion verfehlte der Vergleich der entsprechenden alkoholexponierten Gruppen das definierte Signifikanzniveau (EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24, $p = 0,24$; s. Abb. 16 und Tab. 27).

Der kombinierte Alkohol- und Infektionseffekt führte ebenfalls sowohl 24 als auch 48 Stunden nach der Infektion zu einer signifikanten Reduktion von T_H17-Zellen in der Milz (NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24, p<0,001 sowie NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48, p=0,02, Abb. 16 und Tab. 27).

Weder die isolierte Alkoholbehandlung noch der Vergleich der gemessenen Zeitpunkte (24 bis 48 Stunden nach der Infektion) ergab signifikante Zellzahlveränderung der IL-17 exprimierenden T-Zellen in der Milz (Abb. 16 und Tab. 27).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,20
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,78
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,63
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,94
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	***	<0,0001
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	*	0,02
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,24
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	*	0,01
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	**	<0,001
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	*	0,02
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,75
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,19
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,78
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,97

Tabelle 27. IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-17 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

3.3.2.6 Foxp3 exprimierende CD4⁺ T-Zellen in der Milz

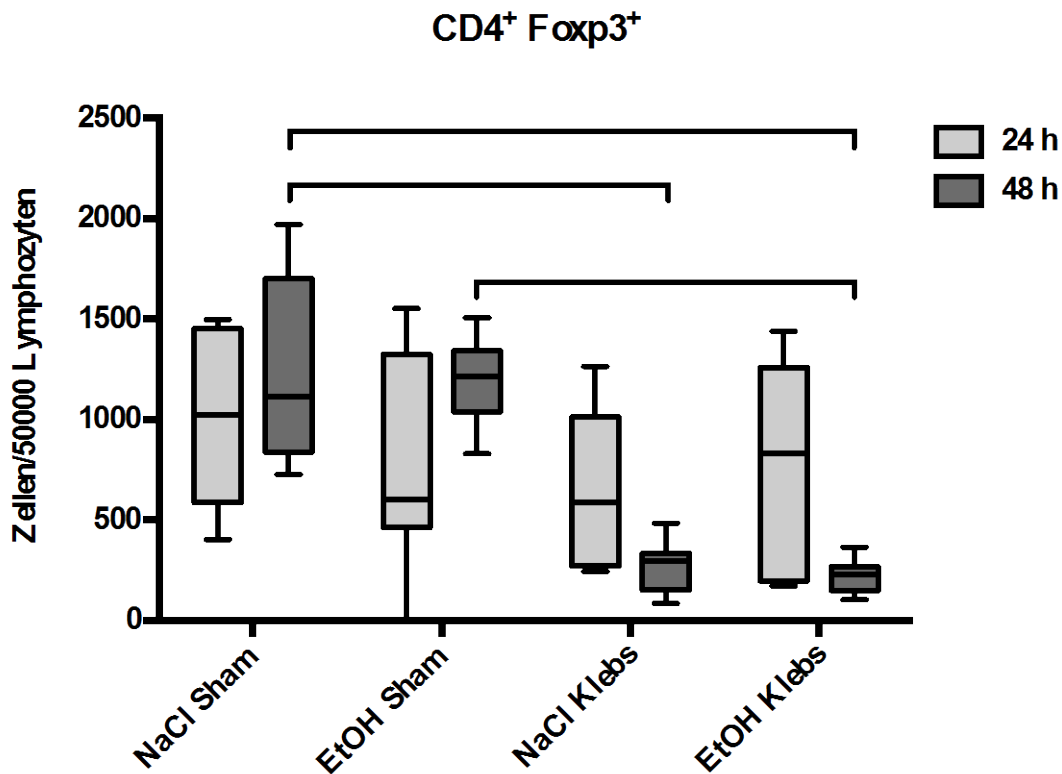


Abbildung 17. Foxp3 exprimierende CD4⁺T-Zellen der Milz: Balb/c Mäuse wurden über 14 d intraperitoneal mit Ethanol bzw. physiologischer NaCl-Lösung exponiert, anschließend laparotomiert und schließlich 48 h später nasal mit *K. pneumoniae* infiziert /scheininfiziert („Sham“ Gruppe). 24 h und 48 h später wurden die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen präpariert und T-Zellen mit Foxp3-spezifischen Antikörpern markiert. Dargestellt sind Boxplots der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen mit Median, 25./75. Perzentile und Maximum/Minimum. Eckige Klammern markieren Vergleiche zwischen Gruppen, die ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ haben.

Während sich 24 Stunden nach der isolierten (pulmonalen Sham- bzw. *K. pneumoniae*-) Infektion in der Milz noch keine infektionsassoziierten Unterschiede zeigen liessen, war die Zahl der Foxp3-positiven CD4⁺-T-Zellen 48 Stunden nach einer *K. pneumoniae*-Infektion im Gegensatz zu den jeweiligen Sham-Gruppen signifikant reduziert (NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48 und EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48 jeweils $p < 0,0001$, Abb. 17 und Tab. 28).

Die präoperative isolierte Alkoholexposition zeigte keinen signifikanten Effekt auf den Anteil der Foxp3-positiven CD4⁺-T-Zellen. Dagegen führte die kombinierte präoperative Ethanolexposition mit postoperativer *K. pneumoniae*-Infektion nach 48 Stunden ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Foxp3-positiven CD4⁺-T-Zellen (NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48, $p < 0,0001$, Abb. 17 und Tab. 28).

Obwohl bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs das Signifikanzniveau verfehlt wurde, ist dieser Unterschied v. a. mit einer tendentiellen Reduktion von Foxp3⁺ Zellen nach der *K. pneumoniae*-Infektion assoziiert (NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48, p=0,07 sowie EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48, p=0,01, Abb.17 und Tab.28).

Zu vergleichende Gruppen		Signifikanz	p-Wert
Alkoholeffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Sham 24	n.s.	0,50
	NaCl Sham 48 : EtOH Sham 48	n.s.	0,85
	NaCl Klebs 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	1,0
	NaCl Klebs 48 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,52
Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : NaCl Klebs 24	n.s.	0,10
	NaCl Sham 48 : NaCl Klebs 48	***	<0,0001
	EtOH Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,92
	EtOH Sham 48 : EtOH Klebs 48	***	<0,0001
Kombinierter Alkohol- und Infektionseffekt	NaCl Sham 24 : EtOH Klebs 24	n.s.	0,28
	NaCl Sham 48 : EtOH Klebs 48	***	<0,0001
Effekt des zeitlichen Verlaufes	NaCl Sham 24 : NaCl Sham 48	n.s.	0,38
	EtOH Sham 24 : EtOH Sham 48	n.s.	0,13
	NaCl Klebs 24 : NaCl Klebs 48	n.s.	0,07
	EtOH Klebs 24 : EtOH Klebs 48	n.s.	0,10

Tabelle 28. Foxp3 exprimierende CD4⁺ T-Zellen der Milz: Statistische Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz. Die Gruppe mit der höheren Zellzahl wurde hervorgehoben. Die p-Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet. p>0,05 = nicht signifikant (n.s.).

4. DISKUSSION

Präoperativer Alkoholkonsum und postoperative Infektionen beeinflussen das Outcome von Patienten. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von Alkohol und Operation im murinen Infektionsmodell auf die vier Subpopulationen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg} .

- (1) Erwartungsgemäß erholten sich Balb/c-Mäuse schlechter von einer Operation, nachdem sie Alkohol-exponiert oder mit *K. pneumoniae* infiziert waren. Insbesondere die Kombination aus Alkoholexposition und *K. pneumoniae*-Infektion führten zur schlechtesten Erholung. Dies war anhand erhöhter **clinical scores** (also schlechterem klinischen Befinden) ablesbar. Die Gewichtsmessung erbrachte keine statistisch signifikante Entwicklung in dem aufgeführten Modell.
- (2) Als Zeichen einer systemischen Immunmodulation in Richtung T_{H2} durch **Alkohol** zeigte sich in der NaCl Sham-Gruppe ein signifikanter Abfall der IL-4 Sekretion im zeitlichen Verlauf, welcher in der EtOH Sham-Gruppe nicht nachvollziehbar war. Dieser Effekt war in der Lunge nicht nachzuweisen. Entgegen unserer Erwartung führte die isolierte Alkoholbehandlung (in nicht *K. pneumoniae*-infizierten Mäusen) sowohl in der Lunge als auch in der Milz zu keiner signifikanten Veränderung der T_{H17} - und T_{reg} -Zellen. In *K. pneumoniae*-infizierten Mäusen wurden 24 Stunden nach der Infektion in der Lunge sogar signifikant mehr T_{H17} -Zellen gemessen, wenn die Mäuse präoperativ mit Alkohol exponiert waren.
- (3) Während sich 24 Stunden nach der **Infektion mit *K. pneumoniae*** deutlich mehr $CD4^+$ Zellen in der Lunge der infizierten Tiere als in der Kontrollgruppe befanden, glichen sich die Zellzahlen nach 48 Stunden an. Dies war kein Hinweis auf eine Beendigung der adaptiven Immunantwort: In den mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren wird nur die Anzahl an regulatorischen T-Zellen verringert (während sie bei den Sham-infizierten Tieren zunimmt). Hierbei waren sowohl die Veränderungen der gesamten $CD4^+$ T-Zellen als auch der regulatorischen T-Zellen unabhängig von einer präoperativen Alkoholexposition. Die Anzahl der IL-17 exprimierenden Zellen in der Lunge steigt hingegen im zeitlichen Verlauf an. Da in den Lungen Sham-infizierter, nicht-alkoholexponierter Mäuse intrazelluläres INF- γ und in den Lungen *K. pneumoniae* -infizierter, alkoholexponierter Mäuse intrazelluläres IL-4 induziert wird, kann man von einem relativen T_{H2} -Shift durch eine Pneumonie mit *K. pneumoniae* sprechen.

Die Abnahme der regulatorischen T-Zellen nach Pneumonie mit *K. pneumoniae* war ein systemischer Effekt, der auch in der Milz messbar war. Im Gegensatz zur Lunge waren in der Milz weniger IL-17- und IL-4-produzierende T-Zellen bei den *K. pneumoniae*-infizierten als bei den Sham-infizierten Tieren nachweisbar.

- (4) Genau wie bei einer isolierten Pneumonie mit *K. pneumoniae* kam es bei der Kombination aus präoperativer Alkoholexposition und postoperativer *K. pneumoniae*-Infektion zu einem Rückgang der regulatorischer T-Zellen in Milz und Lunge sowie zu einer geringen Sekretion von IL-17 und IL-4 in der Milz im Vergleich zur NaCl-Sham Gruppe.

4.1 FACS-Analyse: Alkohol- und Infektionseffekt auf T-Zell-Subpopulationen

4.1.1 T-Zellen

In unserer Untersuchung führte präoperativer **Alkoholkonsum** weder in der Lunge noch in der Milz nicht zu einer signifikanten T-Zellzahländerung im Vergleich zu den nicht-alkoholexponierten Gruppen. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass im Vorfeld eine Operation stattgefunden hatte, welche – wie einleitend aufgeführt - eine temporäre Immunsuppression bedingen kann (68). Des Weiteren wies Szabo et al. 2001 im humanen peripheren Blut nach moderatem Alkoholkonsum eine Reduktion der T-Zellen nach (69). So kann die fehlende Zellzahlveränderung in unserer Untersuchung dadurch bedingt sein, dass eine Operation sie an dieser Stelle kaschiert.

Eine *K. pneumoniae* -**Infektion** bedingte in unseren Untersuchungsgruppen in der Lunge eine Erhöhung der T-Zellzahl nach 24 Stunden. Dagegen kam es in der Milz nach 48 Stunden zu einer Verminderung der T-Zellen. Dies kann durch eine Rekrutierung der T-Zellen aus der Peripherie zum Infektionsgeschehen (pulmonal) begründet sein. **Die Kombination** aus Infektion und Alkoholkonsum blieb in der Milz ebenfalls ohne signifikante Zellzahlveränderung, während sich in der Lunge nach 24 Stunden eine Zellzahlerhöhung zeigte. Auch dieser Effekt kann durch die aufgeführte Rekrutierung der T-Zellen erklärt sein. Bei der Betrachtung des **zeitlichen Verlaufes** ergab sich 24 bis 48 Stunden postinfektiös in der Lunge in der NaCl Sham-Gruppe und in der EtOH Sham-Gruppe eine Zunahme der T-Zellen, die auch in der EtOH Sham-Gruppe der Milz sichtbar war. Man kann diesen Verlauf so werten, dass die postoperative Suppression von T-Zellen ohne *K. pneumoniae*-Infektion schneller ausgeglichen wird, als nach der bakteriellen Infektion.

4.1.2 CD4⁺T-Zellen

Betrachten wir unserer Untersuchungsergebnisse, fällt auf, dass während sich in der **Milz** in allen verglichenenen Effekten keine signifikante Veränderung der CD4⁺ T-Zellzahl nachweisen liess, dieser in der Lunge mehrfach sichtbar war. Sowohl bei der Untersuchung des Alkoholeffektes, als insbesondere 24 Stunden nach isolierter Infektion und bei Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion wurde eine signifikante Zellzahlerhöhung nachgewiesen (s. Abb 7 und Tab. 18). Möglich ist, dass diese Aktivierung proinflammatorischer Zellen weniger von der Infektion, als von der Operation rührt. Bereits 1997 wies Hensler (70) postoperativ in humanem Blut eine Erhöhung der der CD4⁺ T-Zellzahl nach, welche über mehrere Tage bestehen blieb. Vorstellbar ist, dass diese Erhöhung in unserer Untersuchung der Milz nicht nachweisbar ist, da die hier differenzierten CD4⁺ T-Zellen bereits aus dem gut durchbluteten Organ ausgeschwemmt wurden, während sie in der Lunge, welche durch die Behandlung mit NaCl oder *K. pneumoniae* gereizt wurde, länger verblieben.

4.1.3 IFN- γ exprimierende CD4⁺T-Zellen

Wir detektierten weder in der Lunge noch in der Milz nach isolierter **Alkoholbehandlung** eine signifikante Veränderung der Anzahl der T-Zellen, mit intrazellulärem IFN- γ . Dagegen wurde bereits 1993 ein supprimierender Effekt durch Alkohol (ohne Infektion) auf die IFN- γ -Produktion und damit die T_H1-Antwort von einer Arbeitsgruppe in Arizona (71) im chronischen murinen in vitro-Modell beobachtet. Auch in vivo bedingte eine Ethanolexposition im murinen Modell eine Verminderung der IFN- γ -Produktion in der Lunge und in lungenassoziierten Lymphknoten (72). In einer weiteren experimentellen Untersuchung, bei der die Zytokinantwort nach elf Tagen Alkoholdiät untersucht wurde, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verminderung von IFN- γ (73). Hier könnte die vorher beschriebene inflammatorische Hepatitis jedoch zeitlich noch nicht vorherrschend gewesen sein. Bei humanen Lymphozyten des peripheren Blutes wurden sowohl 0,5 bis 18 Stunden nach Alkoholaufnahme (69, 74), als auch nach moderatem (30-tägigen) Konsum (75) erniedrigte IFN- γ -Werte erwiesen. Bei chronischen Alkoholikern zeigten sich diese ebenfalls in den mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (76). In Gallengansepithelien bei chronischen Alkoholikern fehlte IFN- γ dagegen ganz, während IL-4 als Signifikanzzytokin der T_H2-Antwort nachweisbar war (41). Auch in einer klinischen Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte unterlegt werden, dass bei alkoholkranken Patienten das T_H1/T_H2-Verhältnis vermindert ist (48). Ronis et al. (77) bestätigte dies, beobachtete jedoch auch einen transienten Anstieg des Zytokins in Leberhomogenat von Ratten um den 14. Untersuchungstag, der später regredient war. Warum es zu diesem Shift gegenüber der T_H1-

Antwort kommen kann, könnte an einer diätisch bedingten inflammatorischen Hepatitis liegen, die Kremer et al. 2006 in einem Mausmodell demonstrierte (78). Dort kam es ebenfalls zu einer dominanten T_H1 -Antwort. Zwar ist bei unserer Untersuchung nicht – wie bei Ronis et al. - von einer inflammatorischen Hepatitis im Leberparenchym auszugehen, jedoch sollten wir auch nach einer Sham-Infektion in Form von intratrachealer Kochsalzverabreichung an inflammatorische (nicht bakterielle) Veränderungen im Lungengewebe denken. Entsprechend ist es möglich, dass der supprimierende Effekt von Alkoholkonsum auf das intrazellulär gemessene $IFN-\gamma$ durch die nicht bakterielle Entzündungsreaktion und damit einen $IFN-\gamma$ -Anstieg kaschiert wurde. Da es sich in unserem Fall um ein operatives Modell handelt, können wir nicht von einem „isolierten“ Alkoholeffekt ausgehen, da neben dem Alkoholeffekt auch immer eine operative Intervention erfolgte, die ebenfalls Auswirkungen auf die Immunantwort hat. Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse fällt allerdings auf, dass es bei der Kontrollgruppe 48 Stunden nach der *K. pneumoniae*-Infektion zu einer Verminderung der $IFN-\gamma$ exprimierenden Zellen in der Lunge kommt, während dies nach Alkoholbehandlung nicht der Fall ist. **Operativer Stress** oder Traumata induzieren, wie in der Einleitung aufgeführt, ebenfalls eine Immunsuppression (79). Mehrere Arbeiten belegen die postoperative und posttraumatische Verminderung von $IFN-\gamma$, insbesondere in der frühen postoperativen Phase (70, 80). So kommt es bereits ohne Infektion oder Alkoholkonsum zu einer Verschiebung der T-Helfer-Zellantwort in Richtung T_H2 (81, 47, 82). 2004 wurde in der eigenen Arbeitsgruppe, nachdem schon präoperativ ein vermindertes T_H1/T_H2 -Verhältnis bestanden hatte, eine weitere postoperative Verminderung des Serumlevels von $IFN-\gamma$ bei Langzeitalkoholikern nachgewiesen (48). Zwar gab es in unserer Untersuchung keine Vergleichsgruppen, die nicht operiert wurden, jedoch ist aufgrund der aufgeführten Datenlage von einer additiven Wirkung der vorangegangenen Operation auf das Zellverhältnis in Milz und Lunge auszugehen. Betrachten wir unsere Untersuchungsergebnisse hinsichtlich des **Infektionsgeschehens**, so waren in der Milz keine signifikanten Veränderungen der $IFN-\gamma$ exprimierenden $CD4^+$ -T-Zellen nach einer Infektion mit *K. pneumoniae* nachweisbar. Dagegen zeigte sich in der Lunge nach der Infektion eine Verminderung der $IFN-\gamma$ exprimierenden $CD4^+$ -T-Zellen in der NaCl Klebs 48-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe. Die Datenlage besagt, dass $IFN-\gamma$ exprimierende $CD4^+$ -T-Zellen, also Helferzellen der T_H1 -Zelllinien, bei einer pulmonalen Infektion mit *K. pneumoniae*, eine wesentliche Rolle bei der Proinflammation spielen. Hierzu finden sich Untersuchungen, die allerdings eine vorhergehende Operation noch Alkoholkonsum beinhalteten. Im murinen Modell wurde neben einer verminderten pulmonalen Clearance der Bakterien eine erhöhte Mortalität bei $IFN-\gamma$ -defizienten Knock-out-Mäusen nach einer Infektion mit *K. pneumoniae* festgestellt (61). Bei $IFN-\gamma$ -defizienten Knock-out-Mäusen wurde nach

Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* eine deutliche Progression der pulmonalen Infektion bis zur systemischen Septikämie beobachtet, von der die immunkompetenten Kontrolltiere verschont blieben (83). Die Datenlage besagt außerdem, dass IFN- γ -Behandlung eine effektive antimikrobielle Aktivität bei durch *K. pneumoniae* ausgelösten Wund- oder Lungenentzündungen bedingt (84, 85). In einem murinen operativen Pneumoniemodell wies man ein Absinken der IFN- γ -Konzentration bereits 24 Stunden postoperativ nach. Bei den nicht operierten Tieren war dieses Absinken weniger ausgeprägt (86). Hier wurde der additive Effekt von postoperativem Stress und Infektion auf die Suppression von IFN- γ unterstrichen. Die in der Literatur mehrfach beschriebene Suppression der T_H1-Antwort durch vorangegangene Alkoholbehandlung und operativen Stress kann ursächlich dafür sein, dass die *K. pneumoniae*-infizierten Tiere in unserer Untersuchung nicht mehr in der Lage waren eine T_H1-Antwort zu induzieren. Nach der **Kombination von Alkoholkonsum und Infektion** ergaben unsere Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der IFN- γ -Produktion weder in der Milz noch in der Lunge signifikante Veränderungen. Da der kombinierte Effekt auf IFN- γ ausführlich in experimentellen Studien beleuchtet wurde, müssen wir feststellen, dass hier andere Ergebnisse vorliegen. Bereits 1998 beschrieb Kolls et al. nach einer akuten Alkoholintoxikation im murinen Modell, dass eine ethanolinduzierte Suppression der pulmonalen Abwehr durch IFN- γ -Gentherapie signifikant verbessert werden (84). Ein weiteres murines Infektionsmodell wies bei Mäusen nach Alkoholfütterung über 2 Wochen und *K. pneumoniae*-Infektion eine deutliche Verminderung der bakteriellen Clearance der Lunge und eine verminderte Überlebensrate nach. Außerdem wurde eine Verminderung von IFN- γ und Veränderung des T_H1/T_H2-Verhältnisses zugunsten T_H2 beschrieben (39). Lanzke et al. zeigte 2007 anhand eines murinen Modells nach achttägiger Alkoholfütterung und *K. pneumoniae*-Infektion, dass die IFN- γ -Produktion in Lymphozyten der Milz sowohl bei CD4⁺, als auch bei CD8⁺ T-Zellen vermindert war (60). Die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen könnte damit erklärt werden, dass in unserer Untersuchung der Zeitpunkt der FACS-Analyse relativ früh gewählt wurde.

Jedoch ergaben sich bei der Betrachtung des **zeitlichen Verlaufes** 24 bis 48 Stunden postinfektiös in der Lunge, in der NaCl Sham-Gruppe und in der EtOH Sham-Gruppe eine Zunahme der INF- γ -Produktion. Es ist vorstellbar, dass die postoperative Suppression von IFN- γ ohne *K. pneumoniae*-Infektion schneller kompensiert wird, als nach der bakteriellen Infektion. Da es sich hier um eine lokale Infektion der Lunge handelt, ist das Ausbleiben dieses Effektes in der Milz damit zu erklären. Weshalb hier in der Milz keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ -Sekretion nachgewiesen wurden, kann daran liegen, dass die Milz anatomisch nicht in

direktem Bezug zur Lunge steht oder der früh nach der Infektion gewählte Untersuchungszeitpunkt eine mögliche Zunahme der INF- γ -Produktion verfehlt.

4.1.4 IL-4 exprimierende CD4⁺ T-Zellen

In Lunge und Milz konnte bei den von uns untersuchten Gruppen keine signifikante Zellzahlveränderung der IL-4 exprimierenden CD4⁺T-Zellen (isoliert) nach **Alkoholexposition** nachgewiesen werden. Es liegt eine Studie vor, die 18 Stunden nach moderatem Alkoholkonsum in humanen Lymphozyten einen unveränderten IL-4-Wert nachwies (69), was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Dagegen existieren eine Reihe anderer Veröffentlichungen, in denen **nach isoliertem Alkoholkonsum** ohne Infektion verschiedene Entwicklungen der T_H2-Antwort nachgewiesen wurden. So detektierte Ronis et al. im Tierversuch nach 49-tägiger Alkoholdiät eine Suppression von IL-4 aus Leberhomogenat. Auch eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3, welcher die Entstehung der T_H2-Zellen reguliert, wurde in Hepatozyten nachgewiesen. So das auch hier insgesamt das Bild einer verminderten T_H2-Antwort entstand (77). 1999 wurde in die Immunreaktivität von Gallengangszellen (Lymphozyten und Epithelzellen) von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung untersucht. Hier fand man dagegen eine erhöhte Expression von IL-4 vor (41). In einem murinen Modell fand sich nach chronischem Alkoholkonsum ebenfalls eine erhöhte IL-4 Sekretion (87). Insgesamt spielt hier also auch wieder die Dauer des Alkoholkonsums eine wesentliche Rolle. Erst kürzlich beschrieben Gao et al. aus Bethesda in diesem Zusammenhang, dass NK-Zellen bei Leberfibrose die Produktion von pro-fibrotischen Zytokinen wie IL-4 unterstützen. Hier wurde aber auch darauf hingewiesen, dass die Lymphozyten-Population in der Leber bei Mäusen gegenüber denen beim Menschen eine besonders hohe Anzahl von NK-Zellen aufweist. Dies müsste hinsichtlich eines zukünftigen therapeutischen Ansatzes bedacht werden, der in der Literatur diskutiert wird (88). Zusammenfassend bleibt hinsichtlich der IL-4 exprimierenden CD4⁺T-Zellen nach Alkoholexposition zu sagen, dass ein Ausbleiben eines reinen Alkoholeffektes der Länge der Alkoholexposition zugeschrieben werden muss. Es muss weiterhin bedacht werden, dass es sich um ein operatives Modell handelt, was indirekte Veränderungen auf die T_H2-Antwort mit sich bringt und die Auswirkungen des zu beobachtenden Alkoholeffektes erschwert. **Postoperativ** wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen ein Shift des T_H1/T_H2-Verhältnisses zugunsten der T_H2-Zellen beschrieben (81, 82, 89), wobei dieser Shift durch eine Suppression der T_H1-Zellen zustande kommt und nicht durch eine Erhöhung der IL-4-Sekretion. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten nach der **K. pneumoniae-Infektion** eine signifikante Zunahme der IL-4 sezernierenden T-Zellen in der Lunge der EtOH Klebs 24-Gruppe gegenüber

der EtOH Sham 24- Gruppe, sowie eine Abnahme der IL-4-sezernierenden T-Zellen der Milz in der EtOH Klebs 48-Gruppe nach der *K. pneumoniae*-Infektion gegenüber der EtOH Sham 48-Gruppe. 1998 beschrieb Zisman et al. in der Lunge ebenfalls nach Alkoholbehandlung und *K. pneumoniae*-Infektion einen Shift der Zytokine in der Lunge zugunsten der T_H2-Antwort (39). In der Literatur finden sich dagegen auch Hinweise, dass die IL-4-Konzentration als Indikator für die T_H2-Antwort bei Pneumonien keine wesentliche Rolle spielt. So wurde anhand einer Untersuchung humaner Lymphozyten von RSV (Respiratorische Synzytial-Viren) -infizierten Kindern keine signifikante Konzentrationsveränderung im Vergleich zu gesunden Kindern detektiert (90). Betrachten wir nun unsere Ergebnisse und die aufgeführten Studien, können wir hier anführen, dass in der Lunge nach *K. pneumoniae*-Infektion die T_H2-Antwort forciert wird, während dies in der Peripherie (Blut und Milz) zumindest im Frühstadium, also 24 Stunden nach der Infektion, nicht beobachtet werden kann. Auch die **Kombination aus zweiwöchiger Alkoholbehandlung und *K. pneumoniae*-Infektion** erbrachte in unserer Untersuchung bezüglich der T_H2 Zellen in der Lunge keine signifikante Zellzahlveränderung. Dagegen wurde in der Milz sogar eine verminderte Zellzahl der IL-4 exprimierenden T-Zellen in der EtOH Klebs 24-Gruppe im Vergleich zur NaCl Sham 24-Gruppe nachgewiesen. In der Literatur hingegen ist die Kombination einer *K. pneumoniae*-Infektion mit zweiwöchigem Ethanolkonsum im murinen Modell (39) mit einem deutlichen Shift zur T_H2-Antwort gegenüber der T_H1-Antwort assoziiert. Diesen Effekt bestätigten unsere Untersuchungsergebnisse nicht. In der gerade aufgeführten Untersuchung von Zisman (39) wurde IL-10, das ebenfalls von T_H2-Zellen produziert wird, als Marker für die T_H2-Antwort untersucht, während wir uns IL-4 bedienten. Es kann davon ausgegangen werden, dass hier noch nicht aufgedeckte Wechselwirkungen zwischen diesen Zytokinen eine Rolle spielen können, was die Untersuchungsergebnisse nicht vergleichbar macht. Zu bedenken ist ebenfalls die hemmende Auswirkung von IFN- γ auf die IL-4-Sekretion. Dagegen kam eine Forschergruppe aus Spanien zu einem Ergebnis, welches dem unseren glich: Hier wurde das Blut von 66 Patienten untersucht, die an Hepatitis C erkrankt waren. Die Alkoholiker (n=26) unter ihnen wiesen eine signifikant verminderte IL-4-Konzentration im Vergleich zu den nicht Alkohol trinkenden Patienten auf (91). Im **zeitlichen Verlauf** kam es in unserer Analyse 48 Stunden nach der Infektion in der Milz zu einer weiteren signifikanten Abnahme der IL-4 exprimierenden T-Zellen bei den nicht Alkohol-exponierten Gruppen. Die Tiere nach Alkoholbehandlung gehen bereits von einem erniedrigten Status aus, so dass über die Zeit keine Abnahme verzeichnet werden konnte. In der Lunge waren keine signifikanten Zellzahlveränderungen nachweisbar. Der Untersuchungszeitpunkt scheint hier ein wichtiger Aspekt zu sein: In einem murinen Modell (92) wurde nach nasaler Infektion mit *Campylobacter*

jejuni (*C.jejuni*) erst nach drei bis fünf Tagen eine Produktion von IL-4 und IL-10 und damit eine anti-inflammatorische T_H2-Antwort detektiert. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass es erst später zu einem T_H2-Shift kommt. Bezüglich der klinischen Relevanz ist hier noch eine Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe zu nennen, die ebenfalls auf der Verschiebung des T_H1/T_H2-Verhältnisses bei Langzeitalkoholikern beruht. 2006 wurden 122 Patienten, die sich wegen einer Krebserkrankung des Magen-Darm-Traktes oder der Atemwege einer elektiven Operation unterziehen lassen mussten, in einer randomisierten Doppelblindstudie eingeschlossen. Davon erhielten 60 Patienten perioperativ Morphin, Ketokonazol oder Ethanol, wodurch es postoperativ neben der Reduktion eines Hyperkortisolismus zu einer verminderten Beeinträchtigung des T_H1/T_H2-Verhältnisses sowie zu einer Verminderung der Pneumonierate im Vergleich zu dem Patientenkollektiv, welches mit einem Placebo behandelt wurde, kam (93). Diese Arbeit unterstreicht, dass das genaue Wissen um die postoperative Zytokinveränderung bei alkoholkranken Patienten zur Vorbeugung oder im Zusammenhang mit Infektionen von Wichtigkeit ist und schon heute, aber insbesondere in Zukunft in die Patientenbehandlung einbezogen werden sollte.

4.1.5 IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen

In unserer Untersuchung war nach **Alkoholbehandlung** in der NaCl Klebs 24-Gruppe in der Lunge eine sehr signifikante Zunahme der IL-17 exprimierenden T-Zellen nachweisbar, während sich in der Milz diesbezüglich allerdings keine signifikanten Zellzahlveränderungen ergaben. Im murinen Modell ohne Infektion wurde bereits wiederholt nach subchronischem Alkoholkonsum (14 und 11 Tage) eine vermindert IL-17-Expression in CD4⁺ Lymphozyten der Milz detektiert (43, 73). In der dem Autor vorliegenden Literatur gibt es Hinweise, dass Patienten mit Alkoholtoxischer Hepatitis höhere Serumwerte von IL-17 aufweisen, als gesunde Patienten und chronische Hepatitis-C-Patienten. Auch in den entsprechenden Leber-Biopsien waren mehr T_H17-Zellen nachweisbar, welche in den hepatischen Sternzellen die Neutrophilenakkumulierung induzieren (94, 95). Wir wiesen in der Lunge keine Veränderung der Zellzahl IL-17 exprimierender T-Zellen nach einer ***K. pneumoniae*- Infektion** weder in der EtOH noch in der NaCl Gruppe nach. Allerdings war in der Milz sowohl in der NaCl Sham 48-Gruppe, als auch in der EtOH Sham 48-Gruppe eine signifikante postinfektiöse Verminderung IL-17 exprimierender T-Zellen nachweisbar. Ursächlich für diese Verminderung der T_H17-Antwort in der Milz können mehrere Aspekte sein: Neben dem inhibierenden Einfluss anderer Zytokine, wie IFN- γ oder IL-4, kann auch der Untersuchungszeitpunkt für eine systemische Antwort zu früh gewählt sein. Hierauf wird später noch genauer eingegangen. Hinsichtlich einer

isolierten Infektion wurde in der Literatur schon 2001 im murinen Modell belegt, dass die IL-17-Konzentration im Lungenhomogenat bei tracheal mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren mit der Bakterienlast korrelierte und kein IL-17 in der Kontrollgruppe nachweisbar war, die nasal PBS erhielten (44). Im gleichen Jahr wurde im Tierversuch festgestellt, dass bei Mäusen mit defizienten IL-17-Rezeptor eine größere Ausbreitung von *K. pneumoniae* in den Alveolen vorlag, als bei Mäusen der Kontrollgruppe (26). Happel bestätigte ebenfalls im murinen Modell, dass IL-17 eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen *Klebsiella pneumoniae* hat (42). Mittlerweile bestehen Ansätze zur T_H17-gezielten Immuntherapie in der Behandlung und Prävention von Infektionen (96). In der Milz war nach zweiwöchiger Alkoholbehandlung und postoperativer *K. pneumoniae*-Infektion eine verminderte Zellzahl IL-17 exprimierender T-Zellen in der NaCl Sham-Gruppe sowohl 24 als auch 48 Stunden nach der Infektion nachgewiesen. Dagegen zeigten sich in der Lunge keine signifikanten Veränderungen der IL-17-Produktion unter der Kombination Alkoholbehandlung und Infektion. Da IL-17 zu den proinflammatorisch wirkenden Zytokinen gezählt wird, und in der Lunge eine größere Entzündungsreaktion erwartet wird, als in der Milz, kann die unterschiedliche Reaktion auf die Lokalisation der Probeentnahmen zurückzuführen sein. Insgesamt stellt der o.g. additive Effekt der IL-17 Suppression durch Alkohol und Infektion eine der Hauptaussagen unserer Untersuchung dar und bestätigt die in der Literatur angegebene Erfahrung (43). Nach zweiwöchiger Alkoholdiät und anschließender Infektion mit *K. pneumoniae* wurde im murinen Modell eine supprimierte Freisetzung von IL-17, eine verminderte Rekrutierung von Neutrophilen im Lungengewebe sowie eine erhöhte Mortalität gegenüber nicht mit Alkohol vorbehandelten Mäusen beschrieben (43). Bei der Betrachtung des **zeitlichen Verlaufes** kam es in der Lunge in der NaCl Klebs Gruppe zu einer höchst signifikanten Zunahme der IL-17 exprimierenden T-Zellen. In der Milz wurde jedoch keine signifikante Zellzahlveränderung im zeitlichen Verlauf detektiert. Da die proinflammatorisch wirkenden, IL-17-produzierenden CD4⁺-T-Zellen eine entscheidende Rolle bei Autoimmunerkrankungen (97) spielen, bestehen Voruntersuchungen aus der Transplantationsmedizin. Min et al. beschrieben in einem murinen kardialen Transplantationsmodell 2009 ohne Infektion am dritten postoperativen Tag ein Anstieg der Serum-IL-17-Wertes, der im weiteren Verlauf absank (72). Da zum Untersuchungszeitpunkt der 24-Stunden-Gruppe, die Operation bereits drei Tage und bei der Präparation der 48-Stunden-Gruppe die Operation bereits vier Tage zurück lag, können wir sagen, dass sich diese Ergebnisse mit unseren decken. Eine japanische Forschergruppe untersuchte 2012 diesbezüglich ebenfalls an Balb/c-Mäusen den IL-17-Verlauf aus Zellen einer Bronchiallavage nach Mycoplasmeninfektion (98). Hier wurde erst 2 Tage nach der Infektion ein IL-17-Peak

detektiert, während andere Marker wie IL-6 und TNF- α bereits nach 12 bis 24 Stunden anstiegen. Entsprechend ist zu erwägen, dass in der Milz erst später eine IL-17-Reaktion entsteht.

4.1.6 Foxp3 exprimierende CD4⁺T-Zellen

Unsere Ergebnisse gaben nach **Alkoholbehandlung** ohne Infektion keine signifikanten Zellzahlveränderungen Foxp3-exprimierender T- Zellen sowohl in der Lunge als auch in der Milz wieder. In den wenigen hierzu vorliegenden Studien wurde erst kürzlich die Auswirkung auf Alkoholbehandlung auf die Foxp3-Expression behandelt. So untersuchte eine Forschergruppe aus Washington neben der IFN- γ auch die Foxp3-Expression im *B16-BL6*-Melanom-Maus-Modell nach dreimonatigem Alkoholkonsum, weil festgestellt worden war, dass chronischer Alkoholkonsum die Mortalität von subkutan *B16-BL6-Melanom*-Zellen tragenden Mäusen steigerte. Chronischer Alkoholkonsum verminderte die Melanom-induzierte Expansion der T-Gedächtniszellen und beschleunigte die Abnahme von IFN- γ produzierenden T-Zellen, während die Zellzahl Foxp3 exprimierender T-Zellen im Vergleich dazu nicht beeinträchtigt war (45). Erst 2011 folgte eine weitere Studie in China, wo im Mausmodell nach 90-tägiger Alkoholdiät die kardiale Struktur und Funktion (mittels Echokardiographie) und regulatorische T-Zellen aus der Milz mittels FACS-Analyse untersucht wurden. Hier ergaben sich auch keine statistisch relevante Zellzahlveränderung (46), was unsere Untersuchungsergebnisse nochmals unterstreicht. Alkoholbehandlung allein scheint keine direkten Auswirkungen auf die Zahl der regulierenden T-Zellen zu haben. Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen supprimieren die Immunantwort. Es wurden Subphenotypen von Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen in unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen gefunden. Einige dieser Subphenotypen kontrollieren speziell Facetten der Effektor-T-Zell-Funktionen (99). Obwohl viele Mechanismen für die T_{reg}-Zell-Suppression in vitro nachgewiesen wurden, ist bisher unklar, ob die gleichen oder andere Mechanismen in vivo gelten (100). Hiermit sei nochmals unterstrichen, dass regulatorische T-Zellen, und Ihre Wechselwirkungen sich noch in Erforschung befinden, was die Relevanz unserer Ergebnisse gerade im Zusammenhang mit Alkoholkonsum unterstreicht. Hierzu liegen bisher nicht viele Untersuchungen vor. Eine **postoperative Verminderung** von regulatorischen T-Zellen ohne Infektion und ohne Alkoholkonsum wäre durch die bekannte Inhibierung durch IL-6 zu erklären, einem Akute-Phase-Protein, welches nicht nur nach Operationen sondern auch nach Entzündungsreaktionen ausgeschüttet wird (20, 64). Das Verhältnis von T_{reg}- zu T_H17-Zellen ist entsprechend zahlreicher Angaben in der Literatur entscheidend für die Immunantwort. Je nach Übergewicht zu der einen oder anderen Subpopulation resultiert Immunsuppression oder

Hyperinflammation. TGF- β ist für die Differenzierung von T_{reg}- und T_H17-Zellen erforderlich (101, 102). In Anwesenheit von IL-6 wird die Expression von regulatorischen T-Zellen vermindert und die Differenzierung von T_H17-Zellen initiiert (101, 20, 103). In unserer Untersuchung kam es sowohl in der Lunge als auch in der Milz 48 Stunden nach der **K. pneumoniae-Infektion** zu einer signifikanten Abnahme Foxp3 exprimierender T-Zellen. Dies war sowohl in der Gruppen mit als auch ohne Alkoholbehandlung der Fall. Diese Ergebnisse können ebenfalls durch die hemmende Wirkung von IL-6 auf Foxp3 erklärt werden (104, 105), die sich auch im murinen Modell bestätigen liess (20) und so auch für unsere Untersuchung eine Rolle spielen kann. Betrachten wir aber die in der Literatur vorliegenden Erkenntnisse hinsichtlich Foxp3 im Rahmen eines Infektionsgeschehens, zeigen sich andere Ergebnisse: In einer 2008 erschienen tierexperimentellen Studie wurde demonstriert, dass murine pulmonale Stromazellen unreife dendritische Zellen dazu induzieren können, zu regulatorischen dendritischen Zellen zu differenzieren und proliferieren. Diese supprimieren die T-Zell-Proliferation und generieren Foxp3-sezernierende CD4⁺T-Zellen, die wiederum die T-Zell-vermittelte eosinophile Luftwegsinfektion in vivo vermindern (106). Ebenfalls im murinen Infektionsmodell wurde beobachtet, dass nach Aerosolinfection von *Mycobacterium tuberculosis* regulatorische T-Zellen proliferieren und an den Orten der Infektion (also pulmonal) akkumulieren sowie durch Suppression der Immunantwort die Tuberkulose kontrollieren (107). Zu beachten ist jedoch, dass im Rahmen der beiden letztgenannten Veröffentlichungen viel spätere Untersuchungszeitpunkte – nämlich frühestens 5 Tage nach der Infektion – gewählt wurden. Hier ist davon auszugehen, dass die durch Foxp3-sezernierende CD4⁺T-Zellen hervorgerufene Immunantwort erst jenseits der 48 Stunden post infectionem offensichtlich wird, die wir in unserem Modell untersucht haben. Des Weiteren kam es bei unserer Untersuchung auch nach der **Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion** sowohl in der Lunge als auch in der Milz zu einer signifikanten Abnahme Foxp3 exprimierender T-Zellen in der NaCl Sham 48-Gruppe nach der Infektion mit *K. pneumoniae* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser kombinierte Effekt wurde in der Literatur hinsichtlich einer Veränderung der Foxp3-Produktion noch nicht differenziert untersucht. Da wir bei dem reinen Alkoholeffekt auf Foxp3 exprimierenden T-Zellen in Milz und Lunge keine signifikanten Zellzahlveränderungen sahen, ist davon auszugehen, dass die Abnahme der Zellen durch die Infektion bedingt wurde, also nicht aufgehoben oder verstärkt wurde. Diese Abnahme erscheint unter klinischem Aspekten sinnvoll, da die Infektion bekämpft werden muss. Lediglich **im zeitlichen Verlauf** stiegen in der Lunge die Foxp3 exprimierenden T-Zellen in der NaCl Sham-Gruppe und in der EtOH Sham-Gruppe signifikant an, während die Foxp3 exprimierenden T-

Zellen in der EtOH Klebs-Gruppe und der NaCl Klebs-Gruppe sehr signifikant abnahmen. Da wir aus unseren Ergebnissen und aus den Angaben der Literatur wissen, dass Alkohol alleine keinen Effekt auf die Foxp3-Expression hat, ist dies dem Infektionseffekt zuzuschreiben. Dieser kann durch eine Induktion von IL-6 und damit einer Suppression von Foxp3 bedingt sein (108, 103). Denkbar ist auch, dass die Zunahme der Foxp3 exprimierenden Zellen durch die Operation bedingt ist. Nur bei der NaCl Klebs-Gruppe in der Lunge und auch nur im zeitlichen Verlauf konnten wir nach einer Infektion anhand unserer Ergebnisse eine komplett gegensätzliche Reaktion der regulatorischen T-Zellen gegenüber der T_H17-Zellen nachweisen, was darauf zurückzuführen sein kann, dass hier die Infektion und damit die pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine wie IL-17 und IL-6 dominant sind. Bemerkenswert erscheint in unserer Untersuchung, dass bei den nicht mit *K. pneumoniae* infizierten Tieren in der Lunge eine Zunahme der Foxp3-Expression über die Zeit nachgewiesen wurde. Da hier sowohl Gruppen mit als auch ohne Alkoholbehandlung betroffen sind, ist von einem Operationseffekt auszugehen. Übergeordnet ist hier der Heilungsprozess, dem eine zu starke proinflammatorische Reaktion schaden würde. Folge ist eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen.

Unser primäres Ziel war, die Wirkung von Alkohol und Infektion im operativen Modell auf die Subpopulationen T_H17 und T_{reg} zu untersuchen. Das klassisch bestimmte T_H1/T_H2-Verhältnis wurde im Vorfeld wiederholt durchleuchtet. Entsprechend waren unsere wichtigsten Ergebnisse folgende: Eine isolierte *K. pneumoniae*-Infektion führte zur Reduktion von T_{reg}-Zellen in Lunge und Milz sowie zur Verminderung von T_H17-Zellen in der Milz. Die Kombination aus Alkoholbehandlung und Infektion führte sowohl in der Lunge als auch in der Milz zu einer signifikanten Abnahme von T_{reg}-Zellen. Diese Reduktion der regulatorischen T-Zellen scheint durch die Infektion bedingt zu sein, auf die reagiert werden muss. Ursächlich kann hier die hemmende Wirkung des Akute-Phase-Proteins IL-6 auf T_{reg}-Zellen sein.

Kausal für die postinfektiöse Verminderung der T_H17-Antwort in der Milz können neben dem inhibierenden Einfluss anderer Zytokine, wie IFN- γ oder IL-4, auch der für eine systemische Antwort früh gewählte Untersuchungszeitpunkt sein.

4.2 Körpergewicht und Clinical Score

Der Zustand nach Operation und Alkoholkonsum geht mit einem schlechten klinischen Erscheinungsbild einher, wie durch einen erhöhten CS dargestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Literatur (59, 60). Hinsichtlich der postoperativen Gewichtsveränderungen im

murinen Pneumoniemodell gilt diese Übereinstimmung jedoch nicht. Während unsere Untersuchungen in allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied des Gewichts vom ersten zum letzten Untersuchungstag aufwiesen, wurde 2008 von Spies et al. ein Gewichtsverlust bei alkoholbehandelten Balb/c-Mäusen nach *K. pneumoniae*-Infektion beschrieben (59). In letzterer Untersuchung wurden die Tiere allerdings nur 8 Tage mit Alkohol behandelt, an Tag 8 operiert und an Tag 10 der Untersuchung mit *K. pneumoniae* infiziert. So ist davon auszugehen, dass das längere postoperative Zeitintervall unserer Untersuchung den Tieren die Möglichkeit zur Erholung gab.

4.3. Methodendiskussion

4.3.1 Balb/c-Maus

Balb/c-Mäuse werden im tierexperimentellen Modell der Alkoholforschung favorisiert (73, 109, 58, 59), auch in Kombination mit Operations- und Infektionsmodellen (60, 110). Allerdings wurde mehrfach eine genetische Prädisposition von Balb/c Mäusen für eine T_H2- Immunantwort beschrieben, während C57BL/6 Mäuse im Vergleich dazu auf Infektionen mit einer dominanten Reaktion der T_H1-Zellen reagieren (111, 112, 113). Die Prädisposition von Balb/c Mäusen zugunsten der T_H2- Antwort beruht zum einen auf einer gesenkten Expression von IL-12 α auf CD4⁺ Zellen und andererseits auf einer Suppression von IL-12 und Stickstoffmonoxid (NO) in Makrophagen durch erhöhte Prostaglandin E2 (PGE₂)-Aktivität (114). Außerdem scheint der Hormonstatus der weiblichen Balb/c Mäuse eine Rolle zu spielen, wie in einem murinen Modell dargestellt wurde (115). Nach der Initiierung einer virusbedingten Myokarditis reagierten weibliche Mäuse verglichen mit den männlichen Versuchstieren vorrangig mit einer T_H2- Immunantwort. Die Behandlung der weiblichen Tiere mit Testosteron oder der männlichen Tiere mit Östradiol vor der Infektion veränderte später die Differenzierung der T-Helferzellen. Trotz dieser Besonderheiten bediente man sich, wie aus der Literatur ersichtlich, in der Erforschung der Immunregulation weiterhin der Balb/c-Mäuse, da die Ergebnisse durchaus auf die menschliche Immunantwort übertragbar sind und das murine Modell viele Vorteile in der Handhabung hat, wie beispielsweise die Etablierung von Operations-, oder Infektionsmodellen, aber auch bei der Untersuchung zukünftig möglicher therapeutischer Interventionen (wie die Verwendung rekombinanter Adenoviren, Zytokinsubstitution und weiteres). Ein weiterer Vorteil des murinen Modells gegenüber klinischen Studien am Menschen ist, dass bei letzteren Komorbiditäten zu bedenken bzw. auszuschließen sind. Hier sind chronische Infektionskrankheiten, Krebserkrankungen, Drogen- und Medikamentenabusus oder andere (eventuell noch nicht bekannte) Gegebenheiten, die Auswirkungen auf die Immunmodulation der

Patienten haben, zu nennen. Des Weiteren lassen sich im murinen Modell die einzelnen Untersuchungsfaktoren wie in unserem Modell die Alkoholverabreichung, die Operation sowie die Infektion standardisieren und optimaler analysieren, als es bei klinischen Studien möglich, wenn überhaupt ethisch vertretbar ist.

4.3.2. Alkoholverabreichung

Alkoholinjektionen wurden intraperitoneal verabreicht, da man so die Dosierungen körperrgewichtsadaptiert und standardisiert verabreichen konnte. Bei den Tieren, die Kochsalzlösung injiziert bekamen, wurden die gleichen Volumina der Injektionsdosis verabreicht, um den Injektionsreiz und die intraperitoneale Volumenbelastung zu imitieren. Zu bedenken ist, dass die Injektionen jeweils kleinen Traumata entsprechen, die einem Operationsreiz gleichen. Trotz dieser Injektionen zeigten alle Tiere in der Phase vor der Operation eine Gewichtszunahme, was dafür spricht, dass das Ausmaß des Traumas durch den Injektionsreiz nicht wesentlich ist.

Ein weiterer Stressfaktor für die Untersuchungstiere ist das tägliche manuelle Fixieren zur Injektion. Den Untersuchungszeitpunkt zur Erhebung des klinischen Scores wählten wir aus diesem Grund vor der Injektion. In der Literatur finden sich unterschiedliche Verabreichungsmöglichkeiten der Alkoholdosis, so auch die Zufuhr über das Futter (71, 63, 116). Hierbei wurden durch die Zufuhr ad libitum sehr unterschiedliche Blutalkoholkonzentrationen der Tiere erreicht. Zudem wiesen Salerno und Watenbaugh (116) Blutalkohol-Werte von 1 – 1,5 Promille unter der oralen Fütterung nach. Dahingegen erreichten wir mittels der intraperitonealen Substitution stabile hohe Blutalkoholkonzentrationen, welche auch bei dem binge-Trinker erreicht werden (58). Unser Studiendesign bezog sich auf subchronischen Alkoholkonsum, welche den Vorteil hat, sich auf die direkten Alkoholauswirkungen zu beschränken. Bei chronischer Alkoholsubstitution über mehrere Wochen und Monate sind Leberzirrhose und Vitaminmangel zu erwarten, die sekundäre Auswirkungen auf die immune Lage der Tiere haben (71, 77).

Die klinische Relevanz dieser Studie ergibt sich hier also vor allem für das Patientengut, welches noch keine der gerade aufgeführten Sekundärschäden hat. Andere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit den Auswirkungen akuten Alkoholkonsums beschäftigt. Diese reichen vom einmaligen Konsum (117, 69) bis zur Alkoholaufnahme über mehre Tage (118).

4.3.3. Clinical Score

Ziel des klinischen Scores ist eine genauere Beurteilung des Befindes der Mäuse, als es mittels des alleinigen Gewichtsverlaufes möglich ist. Die Frage ist, ob dieser Score ausreichend objektiv ist, um dieses Ziel zu erreichen. Die Ermittlung des Gewichtes ist im Gegensatz zur Festlegung des Scores komplett objektiv. Die Festlegung eines Scores ist trotz der in Kapitel 2.2.6. aufgelisteten Merkmale zur Festlegung der Punktzahl von der subjektiven Einschätzung des Untersuchers abhängig. Da sich viele murinen Modelle auf das Gewicht und die allgemeine Aktivität des Untersuchungstiere beziehen, besteht die Frage, ob ein clinical score sinnvoll ist oder ob man den von uns angewandten Score optimieren kann. Zum Beispiel kann hinterfragt werden, ob die Veränderung der Motorik und des Haarkleides in gleicher Weise in die Gesamtbeurteilung einfließen sollte, wie die Beschaffenheit der Schleimhäute. Letztere ist schwer zu beobachten und oft erst bei sehr schlechtem Allgemeinzustand verändert. Daneben ist fraglich, ob ein ungepflegtes Haarkleid auch mit einer motorischen Einschränkung einhergehen muss oder auch nur auf eine gewisse Trägheit der Tiere hinweisen kann. Insgesamt kann hinterfragt werden, ob objektive Parameter wie Körpertemperatur, Sauerstoffsättigung im Blut, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Blutdruck eine bessere Auskunft über den Allgemeinzustand der Tiere machen könnten. Nachteil dieser Untersuchungsparameter wäre jedoch die auf die Mäuse einwirkende Stresssituation unter den Messungen (und dadurch möglicherweise induzierte Zytokinausschüttungen).

4.3.4. Operationsmodell

Wir bedienen uns eines Operationsmodells, welches bereits vielfach angewandt wurde (119, 120), auch in unserer Arbeitsgruppe (60, 59). Im Rahmen dieser Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass operativer Stress induziert wurde, was unsere Auswertung des Clinical Scores und des Gewichtsverlaufs bestätigte. Vorteile dieser Methode waren die standardisierten Arbeitsabläufe, die sichere Handhabung und die gute Erlernbarkeit. Nachteil dieser Methode waren die möglichen postoperativen Komplikationen wie Narbenhernie oder Nahtdehiszenz, die leider dazu führten, dass 2 Versuchstiere vorzeitig getötet werden mussten. Hierdurch waren die Anzahl der Tiere, welche aus Gründen des Tierschutzes möglichst klein gehalten war, noch weiter minimiert. So sind auch partiell die relativ großen Streubreiten der Untersuchungsergebnisse zu erklären. Zudem ist anzumerken, dass die klinische Beurteilung der Tiere zur Erhebung des Clinical Scores teilweise eine subjektive Komponente hat. Um diesen Fehlerfaktor zu minimieren, wurden die Erhebung der Scores nach strengen Charakteristika (klinischen Gesichtspunkten) vorgenommen.

4.3.5. Infektions-Modell

Neben der nasalen Applikation der Bakterien (59, 83), werden in der Literatur im murinen Modell auch intratracheale (84, 39, 61) und intravenöse Infektionswege beschrieben. Letztere parenterale Substitution wurde insbesondere zur Untersuchung der generalisierten Infektion genutzt (61, 121). Von der trachealen Applikation sahen wir wegen des zusätzlichen Operationsreizes ab und nutzten die intranasale Verabreichung, um Kollateralschäden bei der Infektion zu vermeiden, die eine Tracheotomie mit sich brächte. Außerdem wurden die Bakterien in Sedierung durchgeführt, so dass bei fehlendem Schluckreflex eine ausreichende und identische Menge an Bakterien zugeführt werden konnte. In vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe waren nach identischer Vorgehensweise bei der nasalen Applikation histologische Untersuchungen der infizierten Lunge erfolgt. Hier zeigten sich als Zeichen einer Pneumonie neben der Destruktion des Lungenepithels die Infiltration von Immunzellen und der direkte Keimnachweis. Dieser war auch im peripheren Blut erfolgt um die systemische Infektion nach nasaler Applikation zu beweisen (59). In unserem Modell wurden nicht nur zwei Organe untersucht, um die T-Zell-Subpopulationen zum einen lokal und zum anderen systemisch zu analysieren, sondern es wurden auch zwei unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte nach der Infektion gewählt, um den Zytokin-Verlauf im zeitlichen Intervall zu beleuchten. Diesbezüglich wäre für folgende Studien denkbar, noch spätere Untersuchungszeitpunkte nach der Infektion zusätzlich zu wählen, um zum einen die klinische Erholung und andererseits die weitere Entwicklung des Zytokinmilieus nach Ethanolbehandlung, Operation und Infektion auszuwerten.

4.3.6. Auswahl der untersuchten Organe

Wir untersuchten das Zytokinmilieu in Lunge und Milz der operierten Balb/c-Mäuse mit der Absicht in zwei relevante Organe in der Immunantwort zu beobachten. Zum einen wollten wir die lokale Wirkung der Infektion in der Lunge analysieren. Zum anderen wurde die Milz aufgearbeitet, da diese eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielt. Offen bleibt vorerst, ob die direkte Umspülung der Milz mit dem intraperitoneal verabreichten Alkohol bzw. Kochsalz eine Wirkung auf das später erhobene Zytokinverhältnis hat.

4.3.7. Durchflusszytometrische Analyse

Die Untersuchung von Zytokinen sowie die Analyse von Einflüssen auf deren Produktion stellt eine Herausforderung dar, weil die Zytokinproduktion ein dynamischer Prozess ist. Es liegen nach aktueller Datenlage bisher wenige Erfahrungsberichte hinsichtlich der FACS-Analyse zur Bestimmung der Zytokinwerte von Lungen-T-Lymphozyten in murinen Modellen der Alkohol- und Infektionsforschung vor (110). Dahingegen wurden auf diese Weise zahlreiche

Zytokinuntersuchungen von Milzzellen teils nach Initiierung einer Pneumonie in murinen Modellen (60, 37, 71) untersucht. Des Weiteren erfolgte die FACS-Analyse zur Zytokinbestimmung in unterschiedlichen Zellen, beispielsweise in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (74, 75, 69), in nasopharyngealem Aspirat bei Kindern (90) und in Epithelzellen von Speicheldrüsen (122). Problematisch bei der FACS-Analyse ist, dass ein prozentualer Anteil positiver Zellen (in unserer Untersuchung pro 50.000 Lymphozyten) angegeben wird, und so eher eine qualitative Angabe erfolgen kann, allerdings keine explizite quantitative Angabe über die Menge der exprimierten Zytokine erfolgt. Des Weiteren besteht eine Fehlerquelle bei der Durchführung der Methode, da im FACS-Streudiagramm die Lymphozyten-Gates der Populationen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen manuell gesetzt werden. Aktuell besteht nicht die Möglichkeit, diese Gates standardisiert festzulegen, wodurch hier eine untersucherabhängige Interpretation der Isolierung von Zellpopulationen entsteht, die viel Erfahrung erfordert. Da Zytokine in den letzten Jahren der Erforschung immunologischer Prozesse einen zentralen Brennpunkt darstellen, können sie auf unterschiedliche Weise bestimmt werden, wobei alle Nachweismethoden Vor- und Nachteile aufweisen. Ein großer Teil der Studien, die sich mit dem Einfluss von Alkoholkonsum auf die T-Helferzellmilieu von Menschen beschäftigen, nutzen zur Messung der Zytokinexpression die Enzyme Linked Immunosorbent Assay (**ELISA**)(69, 95). Hierdurch ist es allerdings nicht möglich, die Zytokinproduzierenden Zelltypen zu bestimmen. Wenn dies, wie in dieser Untersuchung, gewünscht ist, bedarf es einer vorherigen Isolierung des gewünschten Zelltyps, wodurch es allerdings bereits zu einer Aktivierung der Zellen und damit zu einer Verfälschung des Zytokinmilieus kommen kann. Ein Vorteil der FACS-Analyse gegenüber dem Zytokinnachweises mittels ELISA besteht in der Möglichkeit, durch Detektion der Oberflächenmarkern der T-Zellen (bspw. CD3, CD4 und CD8) die Herkunft der exprimierenden Zellen zu identifizieren, ohne die Zellpopulation vorher aufgereinigt haben zu müssen. Eine weitere Nachweismethode für Zytokine stellt die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (**RT-PCR**) dar (77, 123). Hier muss allerdings ebenfalls eine Zellpopulation isoliert werden. Außerdem wird zwar die Transkriptionsaktivität eines Gens bestimmt, jedoch kann keine explizite Aussage über die Proteinexpression gemacht werden.

Grundsätzlich handelt es sich um ein ganzheitliches Modell, da es trotz der aufgeführten Schwächen den klinischen Verlauf mit den erhobenen Zytokinveränderungen vereint.

4.4. Perspektiven

Das wesentliche Ergebnis unserer Untersuchung ist, dass präoperativer Alkoholkonsum die Expression von Foxp3, IL-4, IL-17 und IFN- γ exprimierenden CD4⁺T-Lymphozyten beeinflusst und so durch eine Verschiebung der T-Zellverhältnisse die Entstehung und Unterhaltung einer Pneumonie durch *K. pneumoniae* unterstützt.

Betrachtet man nun die klinische Relevanz der Untersuchung, besteht das Ziel Interventionsmöglichkeiten zu finden, die das Auftreten und das Ausmaß einer Immunsuppression durch Alkoholkonsum im Patientenalltag minimiert. Die 2006 erschienene Arbeit von Spies et al. unterstreicht die Relevanz um das Wissen der postoperativen Zytokinveränderung bei alkoholkranken Patienten zur Vorbeugung oder im Zusammenhang mit Infektionen. Diese Doppelblindstudie schloss 122 Langzeitalkoholiker ein, von denen 60 perioperativ Morphin, Ketokonazol oder Ethanol erhielten, wodurch sich die Reduktion eines Hyperkortisolismus, die verminderten Beeinträchtigung des T_H1/T_H2-Verhältnisses sowie die Verminderung der Pneumonierate im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte (93).

Insgesamt stellt der additive Effekt der IL-17 Suppression durch die Alkoholbehandlung und die Infektion eine der Hauptaussagen unserer Untersuchung dar und bestätigt die in der Literatur angegebenen Erfahrungen (43). Mittlerweile bestehen Ansätze zur T_H17-gezielten Immuntherapie in der Behandlung und Prävention von Infektionen (96). Damit dieses Wissen in Zukunft in die Patientenbehandlung einbezogen werden kann, sollten weitere tierexperimentelle Untersuchungen erfolgen, deren Schwerpunkte neben der chronischen Alkoholapplikation auch die Substitution von IL-17 beinhaltet. Außerdem kann der zeitliche Verlauf Zytokinveränderungen weiter untersucht werden, um früher und später auftretende Zytokinveränderungen detektieren zu können.

Auch der postoperative Shift des T_H1/T_H2-Verhältnisses zugunsten T_H2 könnte als Arbeitshypothese aufgenommen werden. Ooshiro et al. zeigte 2004 in einem murinen Modell, dass nach der präoperativen Gabe eines unspezifischen Immunmodulators PSK, die IFN- γ -Konzentration höher war, als in der Vergleichsgruppe ohne PSK. Dadurch konnte das reduzierte T_H1/T_H2-Verhältnis wieder auf ein normales Level korrigiert werden (124). Hier bestünde die Möglichkeit, dieses Modell mit Alkoholbehandlung zu kombinieren, um weitere Aussagen über einen möglichen Therapieansatz zu machen.

Zudem wurde mehrfach eine genetische Prädisposition von Balb/c Mäusen für eine T_H2-Immunantwort beschrieben, während C57BL/6 Mäuse im Vergleich dazu auf Infektionen mit

einer dominanten Reaktion der T_{H1} -Zellen reagieren (111, 112, 113, 114). Um die jeweilige Bevorzugung für die jeweilige T-Helferzell-Subpopulation genauer zu untersuchen, sollte zur Optimierung des murinen infektiösen Operationsmodells ein identischer Untersuchungsaufbau mit beiden Mausinzuchtstämmen durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- 1) World Health Organization. Expert committee on Mental Health, Alcohol Sub-Committee Second Report. W.H.O. Technical Report Series, 1952, 48.
- 2) Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. Nov 2 2002 ; 360 (9343): 1347-1360.
- 3) Statistisches Jahrbuch 2010, Kapitel 2, S. 28: Bevölkerung, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, ISBN 978-3-8246-0898-0.
- 4) Aktuelle Daten zu Drogen und Sucht. In: Drogen- und Suchtbericht 2013, www.drogenbeauftragte.de, Herausgeber: Bundesministerium für Gesundheit. 2013: 17.
- 5) Wagenaar AC, Salois MJ, Komro KA. Effects of beverage alcohol price and tax levels on drinking: a meta-analysis of 1003 estimates from 112 studies. *Addiction*. 2009 Feb; 104(2): 179-90. doi: 10.1111/j.1360-0443.2008.02438.x.
- 6) Gaertner, B. et al. (2014): Alkohol - Zahlen und Fakten zum Konsum. In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.): Jahrbuch Sucht 2014. Lengerich: Pabst Science Publishers (April 2014), ISBN-13: 978-3899679168.
- 7) Burger, Bundes-Gesundheitsurvey Alkohol: Konsumverhalten in Deutschland. Robert Koch-Institut. In Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2003: 5-7.
- 8) Babor TF. The global burden of alcohol consumption. In: *Alcohol: No ordinary commodity. Research and public policy*, second edition, Oxford University Press Oxford, 2010: 48-61.
- 9) Rehm J, Gmel G, Sempos CT, and Trevisan M (2003a). Alcohol-related morbidity and mortality. *Alcohol Res. Health* 27, 39-51.
- 10) Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, and Sempos CT (2003b). The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction* 98, 1209-1228.
- 11) Jensen NH, Dragsted L, Christensen JK, Jorgensen JC, Qvist J. Severity of illness and outcome of treatment in alcoholic patients in the intensive care unit. *Intensive Care Med*. 1988; 15(1): 19-22.
- 12) Breuer JP, Neumann T, Heinz A, Kox WJ, Spies C. [The alcoholic patient in the daily routine]. *Wien Klin Wochenschr*. Sep 30 2003;115(17-18): 618-633.
- 13) Spies C, Tonnesen H, Andreasson S, Helander A, Conigrave K. Perioperative morbidity and mortality in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res*. May 2001; 25(5 Suppl ISBRA): 164S-170S.

- 14) Poznyak V, "Alcohol and Injury in Emergency Departments" , Summary of the Report from the WHO Collaborative Study of Alcohol an Injuries, World Health Organization 2007.
- 15) Bauer C. Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Klinke R, Silbernagl S: Lehrbuch der Physiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage. 1996: 201-204.
- 16) Corthay A. How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. Oct 2009; 70 (4) : 326-336.
- 17) Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest. May 1999; 103 (9): 1345-1352.
- 18) Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. May 26 2000; 101 (5): 455-458.
- 19) Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nat Immunol. Sep 2001; 2 (9): 816-822.
- 20) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. May 11 2006; 441(7090): 235-238.
- 21) Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol. Nov 2005;6(11):1133-1141.
- 22) Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest. May 2006; 116(5): 1218-1222.
- 23) Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol. Jun 15 1993; 150(12): 5445-5456.
- 24) Li H, Chen J, Huang A, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 18 2000; 97(2): 773-778.
- 25) Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. Oct 2004; 21(4): 467-476.
- 26) Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med. Aug 20 2001; 194(4):519-527.
- 27) Nash A, Immunity to viruses. In: Male D, Brostoff J, Roth D. Immunology, 7. Edition, Mo Elsevier. 2006: 249-51.
- 28) Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. Feb 2004; 75(2):163-189.

- 29) Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor *foxp3*. *Immunity*. Mar 2005;22(3):329-341.
- 30) Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul; 8(7): 523-32. Review.
- 31) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, *scurfin*, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. Jan 2001; 27(1): 68-73.
- 32) Haque M, Fino K, Lei F, Xiong X, & Song J. (2014). Utilizing Regulatory T Cells Against Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Oncology*, 4, 209. doi:10.3389/fonc.2014.00209
- 33) Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*. Nov-Dec 1999; 34(6): 830-841.
- 34) Hote PT, Sahoo R, Jani TS, et al. Ethanol inhibits methionine adenosyltransferase II activity and S-adenosylmethionine biosynthesis and enhances caspase-3-dependent cell death in T lymphocytes: relevance to alcohol-induced immunosuppression. *J Nutr Biochem*. Jun 2008; 19(6):384-391.
- 35) Kapasi AA, Patel G, Goenka A, Nahar N, Modi N, Bhaskaran M, Reddy K, Franki N, Patel J, and Singhal PC. (2003). Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Immunology* 108, 313-320.
- 36) Bernstein IM, Webster KH, Williams RC, Jr., Strickland RG. Reduction in circulating T lymphocytes in alcoholic liver disease. *Lancet*. Aug 31 1974; 2(7879): 488-490.
- 37) Starkenburg S, Munroe ME, Waltenbaugh C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res*. Aug 2001;25(8): 1221-1230.
- 38) Alak JI, Shahbazian M, Huang DS, et al. Alcohol and murine acquired immunodeficiency syndrome suppression of resistance to *Cryptosporidium parvum* infection during modulation of cytokine production. *Alcohol Clin Exp Res*. Jun 1993; 17(3): 539-544.
- 39) Zisman DA, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th1- and Th2-phenotype cytokines in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res*. May 1998; 22(3):621-627.
- 40) Potula R, Haorah J, Knipe B, et al. Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune responses in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol*. Apr 2006;168(4):1335-1344.

- 41) Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE. The antigenic heterogeneity of the bile duct epithelium in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group 275. Arch Pathol Lab Med. May 1999;123(5): 411-414.
- 42) Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med. Sep 19 2005; 202(6): 761-769.
- 43) Shellito JE, quan Zheng M, Ye P, Ruan S, Shean MK, Kolls J. Effect of alcohol consumption on host release of interleukin-17 during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. Alcohol Clin Exp Res. Jun 2001; 25(6): 872-881.
- 44) Ye P, Garvey PB, Zhang P, et al. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. Am J Respir Cell Mol Biol. Sep 2001; 25(3):335-340.
- 45) Zhang H, Meadows GG. Chronic alcohol consumption enhances myeloid-derived suppressor cells in B16BL6 melanoma-bearing mice. Cancer Immunol Immunother. 2010 Aug; 59(8):1151-9.
- 46) Liu W, Li J, Tian W, Xu T, Zhang Z. Chronic alcohol consumption induces cardiac remodeling in mice from Th1 or Th2 background. Exp Mol Pathol. 2011 Dec; 91(3): 761-7.
- 47) Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. Surgery. Mar 1996; 119(3): 316-325.
- 48) Spies CD, von Dossow V, Eggers V, et al. Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. Anesthesiology. May 2004; 100(5): 1088-1100.
- 49) Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control. Feb 1985;6(2): 68-74.
- 50) Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. Oct 1998; 11(4): 589-603.
- 51) Dorff GJ, Rytel MW, Farmer SG, Scanlon G. Etiologies and characteristic features of pneumonias in a municipal hospital. Am J Med Sci. Nov 1973;266(5):349-358.
- 52) Garb JL, Brown RB, Garb JR, Tuthill RW. Differences in etiology of pneumonias in nursing home and community patients. Jama. Nov 10 1978; 240(20): 2169-2172.
- 53) Pierce AK, Sanford JP. Aerobic gram-negative bacillary pneumonias. Am Rev Respir Dis. Nov 1974;110(5):647-658.

- 54) Limson BM, Romansky MJ, Shea JG. An evaluation of twenty-two patients with acute and chronic pulmonary infection with Friedlander's bacillus. *Ann Intern Med.* Jun 1956; 44(6): 1070-1081.
- 55) Carden DL, Gibb KA. Pneumonia and lung abscess. *Emerg Med Clin North Am.* Aug 1983; 1(2): 345-370.
- 56) Carpenter JL. Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis.* Jul-Aug 1990; 12(4): 672-682.
- 57) Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, Chang HY, Chen CW. Rapidly fatal outcome of bacteremic Klebsiella pneumoniae pneumonia in alcoholics. *Chest.* Jan 1995; 107(1): 214-217.
- 58) Mason CM, Dobard E, Kolls JK, Nelson S. Ethanol and murine interleukin (IL)-12 production. *Alcohol Clin Exp Res.* Apr 2000; 24(4): 553-559.
- 59) Spies CD, Lanzke N, Schlichting U, et al. Effects of ethanol on cytokine production after surgery in a murine model of gram-negative pneumonia. *Alcohol Clin Exp Res.* Feb 2008; 32(2): 331-338.
- 60) Lanzke N, Kleinwachter R, Kerschischnik S, et al. Differential effects of ethanol on IFN-gamma- and TNF-alpha-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia. *Addict Biol.* Mar 2007; 12(1): 59-68.
- 61) Moore TA, Perry ML, Getsoian AG, Newstead MW, Standiford TJ. Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic Klebsiella pneumoniae infection. *Infect Immun.* Nov 2002; 70(11): 6310-6318.
- 62) www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/pdf_durchflusszytometrie.pdf, Maria Zeilinger, BMA / Univ.Doiz.Dr.med. Wolfgang Hübl, Durchflusszytometrie – eine Einführung.
- 63) www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie_kompensation.htm, Maria Zeilinger, BMA / Univ.Doiz.Dr.med. Wolfgang Hübl, Durchflusszytometrie – Einführung in die Kompensation.
- 64) Kruskal W. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association.* 1952;47(260): 583-621.
- 65) Wilcoxon, 1945; individual comparisons by Ranking, *Methods, biom. Bull* 1: 80-83.
- 66) Mann H. On a test of whether one of two random Variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics.* 1947; 18:50-60.
- 67) Bortz, Lienert, Böhnke: *Verteilungsfreie Methoden der Biostatistik*, 3. Auflage Springer, 2008 (S.256-259).

- 68) Buinauskas P, Mc DG, Cole WH. Role of operative stress on the resistance of the experimental animal to inoculated cancer cells. *Ann Surg.* Oct 1958; 148(4): 642-645; discussion 645-648.
- 69) Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A, Catalano D, Kodys K. Reduced alloreactive T-cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN γ levels. *Alcohol Clin Exp Res.* Dec 2001; 25(12): 1766-1772.
- 70) Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, and Holzmann B. (1997). Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect. Immun.* 65, 2283-2291.
- 71) Chen GJ, Huang DS, Watzl B, Watson RR. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci.* 1993; 52(15): 1319-1326.
- 72) Min SI, Ha J, Park CG, et al. Sequential evolution of IL-17 responses in the early period of allograft rejection. *Exp Mol Med.* Oct 31 2009; 41(10): 707-716.
- 73) Heinz R, Waltenbaugh C. Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* Oct 2007; 31(10):1759-1771.
- 74) Mandrekar P, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Szabo G. Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. *J Immunol.* Sep 1 2004; 173(5): 3398-3407.
- 75) Romeo J, Warnberg J, Nova E, Diaz LE, Gonzalez-Gross M, Marcos A. Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann Nutr Metab.* 2007; 51(4): 359-366.
- 76) Laso FJ, Lapena P, Madruga JI, et al. Alterations in tumor necrosis factor- α , interferon- γ , and interleukin-6 production by natural killer cell-enriched peripheral blood mononuclear cells in chronic alcoholism: relationship with liver disease and ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* Oct 1997; 21(7):1226-1231.
- 77) Ronis MJ, Butura A, Korourian S, et al. Cytokine and chemokine expression associated with steatohepatitis and hepatocyte proliferation in rats fed ethanol via total enteral nutrition. *Exp Biol Med (Maywood).* Mar 2008; 233(3): 344-355.
- 78) Kremer M, Hines IN, Milton RJ, Wheeler MD. Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology.* 2006 Jul;44(1): 216-27.
- 79) Flohe SB, Flohe S, Schade FU (2008). Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate. Immun.* 14, 333-344.

- 80) Walz CR, Zedler S, Schneider CP, Mayr S, Loehe F, Bruns CJ, Faist E, Jauch KW, Angele MK (2007). Depressed T cell-derived IFN-gamma following trauma-hemorrhage: a potential mechanism for diminished APC responses. *Langenbecks Arch. Surg.* 392, 339-343.
- 81) Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg.* Nov 2004; 389(6):475-484.
- 82) O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, MannickJA, Rodrick ML (1995). Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann. Surg.* 222, 482-490.
- 83) Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, et al. Protection against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in mice by interferon-gamma through activation of phagocytic cells and stimulation of production of other cytokines. *J Med Microbiol.* Nov 2001; 50(11): 959-964.
- 84) Kolls JK, Lei D, Stoltz D, et al. Adenoviral-mediated interferon-gamma gene therapy augments pulmonary host defense of ethanol-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res.* Feb 1998; 22(1): 157-162.
- 85) Hershman MJ, Polk HC, Pietsch JD, Kuftinec D, Sonnenfeld G. Modulation of *Klebsiella pneumoniae* infection of mice by interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 405-409.
- 86) Manderscheid PA, Bodkin RP, Davidson BA, Jensen E, Russo TA, Knight PR. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol.* Jul 2004; 11(4): 742-751.
- 87) Song K, Coleman RA, Zhu X, et al. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol.* Dec 2002; 72(6): 1109-1116.
- 88) Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep 26. pii: S0925-4439(12)00217-7. doi:10.1016/j.bbadis.2012.09.008.
- 89) Berguer R, Bravo N, Bowyer M, Egan C, Knolmayer T, Ferrick D. Major surgery suppresses maximal production of helper T-cell type 1 cytokines without potentiating the release of helper T-cell type 2 cytokines. *Arch Surg.* May 1999; 134(5): 540-544.
- 90) Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Diaz PV. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics.* May 2006; 117(5): e878-886.

- 91) Castellano-Higuera A, González-Reimers. Cytokines and lipid peroxidation in alcoholics with chronic hepatitis C virus infection. *Alcohol Alcohol*. 2008 Mar-Apr; 43(2): 137-42. Epub 2008 Jan 23.
- 92) Nadia Al-Banna, Raj Raghupathy, and M. John Albert. Correlation of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Levels with Histopathological Changes in an Adult Mouse Lung Model of *Campylobacter jejuni* Infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 December; 15(12): 1780–1787.
- 93) Spies C, Eggers V, Szabo G, Lau A, V, Schoenfeld H, Althoff H, Hegenscheid K, Bohm B, Schroeder T, Pfeiffer S, Ziemer S, Paschen C, Klein M, Marks C, Miller P, Sander M, Wernecke KD, Achterberg E, Kaisers U, Volk HD (2006). Intervention at the level of the neuroendocrine-immune axis and postoperative pneumonia rate in long-term alcoholics. *Am J Respir. Crit Care Med* 174, 408-414.
- 94) Dhanda AD, Lee RW, Collins PL, McCune CA. Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 Oct 21; 18(39): 5504-13. doi: 10.3748/wjg.v18.i39.5504.
- 95) Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruyse V, Le Moine O, Devière J. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009 Feb; 49(2): 646-57.
- 96) Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. Dec 2008; 226: 160-171.
- 97) Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. Apr 2003; 14(2): 155-174.
- 98) Kurai D, Nakagaki K, Wada H, Saraya T, Kamiya S, Fujioka Y, Nakata K, Takizawa H, Goto H. *Mycoplasma pneumoniae* Extract Induces an IL-17-Associated Inflammatory Reaction in Murine Lung: Implication for Mycoplasmal Pneumonia. *Inflammation*. 2012 Sep 22.
- 99) Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*. Jul 2009; 10(7): 689-695.
- 100) Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. May 2009; 30(5): 636-645.
- 101) Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul; 40(7): 1830-5.

- 102) Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008. 453: 236–240.
- 103) Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-b in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189 (2006).
- 104) Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. Jul 26 2007; 448(7152): 484-487.
- 105) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 485-517.
- 106) Li Q, Guo Z, Xu X, Xia S, Cao X. Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. *Eur J Immunol*. Oct 2008; 38(10): 2751-2761.
- 107) Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*. Sep 3 2007; 204(9): 2159-2169.
- 108) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB., Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD et al., Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006. 441: 231–234.
- 109) Schodde H, Hurst S, Munroe M, Barrett T, Waltenbaugh C. Ethanol ingestion inhibits cell-mediated immune responses of unprimed T-cell receptor transgenic mice. *Alcohol Clin Exp Res*. Aug 1996; 20(5): 890-899.
- 110) Mason CM, Dobard E, Zhang P, Nelson S. Alcohol exacerbates murine pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. May 2004; 72(5): 2556-2563.
- 111) Fukushima A, Yamaguchi T. genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Exp Eye Res*. 2006 Feb; 82(2):210-8.
- 112) Yagi J, Arimura Y. Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2 induced IL-4 production by naïve CD4* T cells. *Int Immunol* 2006 Dec 18 (12) 1681-90.
- 113) Mosmann TR, Coffman RL, 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173.
- 114) Stoy N. Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. *Pathobiology*. 2001; 69(4): 179-211.

- 115) Huber, SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c/mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol.* 1994 Aug; 68(8): 5126-32.
- 116) Salerno JA, Waltenbaugh C, Cianciotto NP. Ethanol consumption and the susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Alcohol Clin Exp Res.* Mar 2001; 25(3): 464-72.
- 117) Szabo G, Catalano D, White B, Mandrekar P. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res.* May 2004; 28(5): 824-8.
- 118) Horvath B, Spies C, Horvath G, et al. Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold. *Biochem Pharmacol.* Aug 1 2002; 64(3): 369-374.
- 119) Zellweger R, Ayala A, Zhu XL, Morrison MH, Chaudry IH. Effect of surgical trauma on splenocyte and peritoneal macrophage immune function. *J Trauma.* Oct 1995; 39(4): 645-650.
- 120) Kamei K, Nimura Y, Nagino M, Aono K, Nakashima I. Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock. *Langenbecks Arch Surg.* Jan 2002; 386(7): 512-517.
- 121) Moore TA, Lau HY, Cogen AL, Monteleon CL, Standiford TJ. Anti-tumor necrosis factor- α therapy during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: increased mortality in the absence of liver injury. *Shock.* 2003 Oct; 20(4):309-15.
- 122) Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Nakamura T, Sato T, Fujita Y, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Hirose Y, Taniguchi M, Sugimoto N, Okazaki T, Umehara H. Skewed Production of IL-6 and TGF β by Cultured Salivary Gland Epithelial Cells from Patients with Sjögren's Syndrome. *PLoS One.* 2012; 7(10): e45689.
- 123) Tatura R, Zeschnigk M, Adamzik M, Probst-Kepper M, Buer J, Kehrmann J. Quantification of Regulatory T Cells in Septic Patients by Real-Time PCR-Based Methylation Assay and Flow Cytometry. *PLoS One.* 2012;7(11):e49962. doi: 10.1371/journal.pone.0049962. Epub 2012 Nov 27.
- 124) Ooshiro M, Sugishita YI, Tanaka H, Koide K, Nagashima M, Katoh R. Regulation of perioperative immunological changes following laparotomy: effects of biological response modifier (BRM) on surgical stress. *Immunol Lett.* Apr 30 2004; 93(1): 33-38.
- 125) BD Biosciences Product Catalog 2008, Fluorochrome Reference Chart, Typical Instrument configuration, Seite 534.

ANHANG

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CD4⁺T-Helfer-Zell-Subpopulationen.

Abbildung 2: Gewichtsverlaufskurve.

Abbildung 3: Evaluierungspunkte des Clinical Score.

Abbildung 4: FACS-Streudiagramm T-Zellen, Lymphozyten, CD4/8 Ergebnisse.

Abbildung 5: FACS-Streudiagramm Foxp3, IL-4, IL-17, IFN- γ .

Abbildung 6: Graphische Darstellung der T-Zellen der Lunge.

Abbildung 7: Graphische Darstellung der CD4⁺-T-Zellen der Lunge.

Abbildung 8: Graphische Darstellung der IFN- γ exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Lunge.

Abbildung 9: Graphische Darstellung der IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Lunge.

Abbildung 10: Graphische Darstellung der IL-17 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Lunge.

Abbildung 11: Graphische Darstellung Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Milz.

Abbildung 12: Graphische Darstellung der T-Zellen der Milz.

Abbildung 13: Graphische Darstellung der CD4⁺ T-Zellen der Milz.

Abbildung 14: Graphische Darstellung der IFN- γ exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Milz.

Abbildung 15: Graphische Darstellung der IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Milz.

Abbildung 16: Graphische Darstellung der IL-17 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Milz.

Abbildung 17: Graphische Darstellung der Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen der Milz

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauch je Einwohner an reinem Alkohol.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Instrumente.

Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien.
Tabelle 4:	Antikörper.
Tabelle 5:	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.
Tabelle 6:	Hard- und Software.
Tabelle 7:	Versuchsablauf.
Tabelle 8:	Gruppeneinteilung.
Tabelle 9:	Fluorchrom-Referenztablette mit Laser und verwendeten Farbstoffen.
Tabelle 10:	Statistisch zu vergleichende Gruppen.
Tabelle 11:	Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test der Gewichte nach Tagen
Tabelle 12:	Wilcoxon-Test der Gewichte nach Gruppen
Tabelle 13:	Mann-Whitney-U-Test des Clinical Scores nach Tagen
Tabelle 14:	Wilcoxon-Test der CS derselben Gruppen an unterschiedlichen Tagen
Tabelle 15:	Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis-Test.
Tabelle 16:	Exemplarische Auflistung Median, Standardabweichung und Anzahl der Tiere in der Lunge bezogen auf 50000 Lymphozyten
Tabelle 17:	Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der T-Zellen der Lunge.
Tabelle 18:	Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der CD4 ⁺ T-Zellen der Lunge.
Tabelle 19:	Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IFN- γ exprimierenden T-Zellen der Lunge.
Tabelle 20:	Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-4 exprimierenden T-Zellen der Lunge.
Tabelle 21:	Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-17 exprimierenden T-Zellen der Lunge.

- Tabelle 22: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Foxp3 exprimierenden T-Zellen der Lunge.
- Tabelle 23: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der T-Zellen der Milz.
- Tabelle 24: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen der Milz.
- Tabelle 25: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IFN- γ exprimierenden T-Zellen der Milz.
- Tabelle 26: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-4 exprimierenden T-Zellen der Milz.
- Tabelle 27: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der IL-17 exprimierenden T-Zellen der Milz.
- Tabelle 28: Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Foxp3 exprimierenden T-Zellen der Milz.

Abkürzungsverzeichnis

ALD	Alcoholic liver disease
APC	Allophycocyanin
BKPP	Klebsiella pneumoniae Pneumonie
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CSF	koloniestimulierender Faktor
CD	cluster of differentiation
CD4 ⁺	CD4-positive T-Zellen
CD8 ⁺	CD8-positiven T-Zellen

cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FITC	Fluorescein isothiocyanat
Foxp3	forhead/winghead helix transcription factor P3
g	Gramm
HLA	human leukocyte antigen
IAP	Immunsuppressivem sauren Protein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVC	Individual ventilated Cages
KBE	Kolonie bildende Einheit
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l	Liter
LAGetSi	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit
KG	Körpergewicht
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

MHC	major histocompatibility complex
NaCl	Kochsalz
NK	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
<i>PGE₂</i>	<i>Prostaglandin E₂</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PB	auch: PBS-BSA, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Rinderserumalbumin, (phosphat buffered saline plus bovine serum albumin)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PSK	Polysaccharid Kureha, Modifikationsmittel
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium (am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute entwickelt)
RSV	Respiratorische-Synzytial-Viren (englisch: Respiratory Syncytial Virus)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
T _H	T-Helfer(-Zellen)
T _{reg}	regulatorische (T-Zellen)
TGF-β	transforming growth factor-β
TNF-α	tumor necrosis factor-α
WHO	World Health Organization

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bianca Storim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Durch Ethanol hervorgerufene postoperative Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg} , am murinen Pneumoniemodell“ 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.

Bisher ist keine Publikation zu dieser Dissertation erfolgt. Daher folgt hier keine weitere Erklärung hinsichtlich meiner Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation

Mashour GA, Driever PH, Hartmann M, Drissel SN, Zhang T, Scharf B, Felderhoff-Muser U, Sakuma S, Friedrich RE, Martuza RL, Mautner VF, Kurtz A. Circulation growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1 Clin Cancer Res. 2004 Sep 1

Posterpräsentationen

Scharf B, Köhler C, Tyman S, Menken KU, Lücke T. Steroid-responsive Enzephalopathie mit Autoimmunthyreoiditis (SREAT) im Kindesalter - eine Rarität. Neurowoche 2014, 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, München, 15.-19.09.2014.

Scharf B, Herweg-Becker A, Lücke T, Hamelmann E, Rothoef T. Präklinische und klinische Behandlung von Verbrennungen und Verbrühungen – interessante Fälle aus dem Zentrum für schwerbrandverletzte Kinder in Bochum. DGKJ-Jahrestagung, Leipzig, 11.-14.09.2014.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Spies, Klinikdirektorin der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum und Campus Charité Mitte für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas sowie die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau PD Dr. med. K. Riebe, meiner ehemaligen Chefärztin, hoch anerkennen. Sie stellte den Kontakt zu meiner Arbeitsgruppe her und war mir auch beruflich in vielerlei Hinsicht ein Vorbild.

Des Weiteren möchte ich Nadine Lanzke für die organisatorische Betreuung dieser Arbeit danken. Sie bewies Ausdauer und Geduld und trug mit ihren kritischen Beiträgen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Den Mitarbeitern der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums möchte ich für die Möglichkeit danken, die Experimente in ihren Laboren durchführen zu können. Mein Dank gilt auch dem Laborteam der AG MINA für ihr Engagement. Ohne deren Mithilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Für die Beratung bei der statistischen Analyse und die kritische Durchsicht des statistischen Abschnitts danke ich Prof. Dr. K.-D. Wernecke (ehemaliger geschäftsführender Direktor des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin).

Nicht zuletzt möchte ich Dr. med. Lilit Sargsyan-Storim danken. Durch ihr Zutun blieb während des experimentellen Arbeitsabschnittes die Freude an der Forschung auch an den langen Abenden erhalten. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Julian für die zahlreichen Stunden der Diskussion und Motivation sowie für die vielen kritischen Bemerkungen.

Abschließend gilt mein Dankgefühl im besonderen Maße meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die immer daran glaubten, dass ich die Herausforderung der berufsbegleitenden Promotion - neben der Erfüllung des Operationskataloges, der vielen Nachtdienste und der Vorbereitung auf die Facharztprüfung - erfolgreich bestehen würde.