

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

DISSERTATION

**Auswirkungen von Alkohol auf Interferon-gamma und  
Tumornekrosefaktor-alpha produzierende Milz CD4+ und  
CD8+ Lymphozyten bei Lipopolysaccharid-induzierter  
Endotoxinaemie am operativen Mausmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lilit Sargsyan

aus Yerevan (Armenien)

Gutachter/in:    1.    Prof. Dr. med. C. Spies  
                          2.    Prof. Dr. med. Ch. Lehmann  
                          3.    Priv.-Doz. Dr. med. vet. J. Unger

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	5
1.1	ALKOHOL.....	5
1.2	OPERATIVER STRESS.....	6
1.3	LPS.....	7
1.4	T-LYMPHOZYTEN.....	9
1.4.1	Einteilung und Aktivierung der T-Lymphozyten.....	9
1.4.2	CD4 T-Lymphozyten.....	10
1.4.3	CD8 T-Lymphozyten.....	10
1.4.4	Auswirkungen von Alkohol und operativem Stress auf T-Zellen.....	11
1.5	TUMORNEKROSEFAKTOR ALPHA.....	12
1.5.1	Effekte von Alkohol und Operation auf die TNF-alpha-Produktion.....	13
1.6	INTERFERON GAMMA.....	13
1.6.1	Effekte von Alkohol und Operation auf die IFN-gamma-Produktion.....	14
2	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	15
3	METHODEN.....	16
3.1	TIERVERSUCHE.....	16
3.1.1	Tierhaltung.....	16
3.1.2	Markierung.....	17
3.1.3	Gruppeneinteilung.....	17
3.1.4	Gesamter Verlauf der Tierversuche.....	18
3.1.5	Injektionen.....	18
3.1.6	Operation.....	19
3.1.6.1	Anästhesie.....	19
3.1.6.2	Mediane Laparotomie.....	19
3.1.7	LPS-Applikation.....	19
3.1.8	Erhebung der klinischen Zeichen.....	20
3.1.9	Euthanasie und Entnahme der Organe.....	20
3.1.10	Histopathologische Untersuchung.....	21
3.1.11	Blutalkoholbestimmung.....	21
3.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER CD4 UND CD8 T- ZELLEN.....	22
3.2.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	22
3.2.2	Isolierung der Leukozyten aus der Milz.....	24
3.2.3	Zählen von Zellen.....	24
3.2.4	Stimulierung der Zellen.....	25
3.2.5	Oberflächenfärbung.....	26
3.2.6	Intrazelluläre Färbung.....	26
3.2.7	Messung.....	27
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	31
4	MATERIALIEN.....	31
4.1	MÄUSE.....	31
4.2	LPS.....	31
4.3	GERÄTE UND INSTRUMENTE.....	32
4.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	33
4.5	ANTIKÖRPER.....	34
4.6	CHEMIKALIEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN.....	34

4.7	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN .....	36
5	ERGEBNISSE .....	37
5.1	KLINISCHER ZUSTAND .....	37
5.1.1	Gewichte.....	37
5.1.2	Klinische Scores .....	39
5.2	PATHOLOGISCHE KRANKHEITSZEICHEN.....	41
5.3	BLUTALKOHOLBESTIMMUNG .....	45
5.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	45
5.4.1	Tumornekrosefaktor alpha .....	45
5.4.1.1	TNF-alpha-Produktion der CD4 T-Lymphozyten.....	46
5.4.1.2	TNF-alpha-Produktion der CD8 T-Lymphozyten.....	47
5.4.2	Interferon gamma.....	50
5.4.2.1	IFN-gamma-Produktion der CD4 T-Lymphozyten.....	50
5.4.2.2	IFN-gamma-Produktion der CD8 T-Lymphozyten.....	52
5.4.3	Tumornekrosefaktor alpha und Interferon gamma.....	55
5.4.3.1	TNF-alpha- und IFN-gamma-Produktion der CD4 T-Lymphozyten .....	55
5.4.3.2	TNF-alpha- und IFN-gamma-Produktion der CD8 T-Lymphozyten .....	57
5.4.4	Zusammenfassung von Ergebnissen der Durchflusszytometrie .....	58
5.4.4.1	CD4 T-Lymphozyten.....	58
5.4.4.2	CD8 T-Lymphozyten.....	59
6	DISKUSSION .....	60
6.1	TUMORNEKROSEFAKTOR ALPHA .....	61
6.1.1	TNF-alpha und Alkohol.....	62
6.1.2	TNF-alpha und LPS .....	63
6.1.3	TNF-alpha und Alkohol-LPS-Kombination .....	64
6.1.4	Schlussfolgerung.....	65
6.2	INTERFERON GAMMA .....	66
6.2.1	IFN-gamma und Alkohol.....	66
6.2.2	IFN-gamma und LPS .....	67
6.2.3	IFN-gamma und Alkohol-LPS-Kombination .....	69
6.2.4	Schlussfolgerung.....	70
6.3	ALKOHOL UND T-LYMPHOZYTEN.....	70
6.4	METHODENKRITIK .....	72
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	76
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	78
10	TABELLENVERZEICHNIS .....	79
11	LITERATURVERZEICHNIS .....	80
12	ANHANG .....	92
12.1	TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER NICHTPARAMETRISCHEN STATISTISCHEN WERTE ....	92
13	DANKSAGUNGEN .....	97
14	LEBENS LAUF .....	98
15	PUBLIKATIONS LISTE .....	100
16	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	101

# 1 Einleitung

## 1.1 Alkohol

Alkohol gehört in Deutschland und den meisten anderen industrialisierten Staaten zu den am häufigsten missbrauchten Substanzen. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes hat sich in der Zeit zwischen 1980 und 2005 die Zahl der alkoholbedingten Sterbefälle in der Bundesrepublik Deutschland von 9.042 auf 16 329 erhöht, was etwa 2% aller Todesfälle entspricht (107).

Laut aktuellen Untersuchungen wird in Deutschland die Zahl der Alkoholabhängigen auf ungefähr 1,6 Millionen geschätzt. Außerdem gibt es ca. 2,7 Millionen Personen, die einen „schädlichen Gebrauch“ von Alkohol betreiben und noch weitere 5 Millionen Menschen mit „riskantem Konsum“. Zusammen sind es etwa 9,3 Millionen aktuelle und potenzielle Behandlungsbedürftige mit Alkoholproblemen (76).



**Abbildung 1: Häufigkeit von Alkoholproblemen in der Bevölkerung der BRD (76)**

Der Anteil von Patienten mit chronischem Alkoholabusus beträgt bis zu 50% aller operativmedizinischen Patienten. Postoperative Komplikationen treten bei ihnen 2-5-mal öfter auf, was zu einer durchschnittlich 50%-igen Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes führt (58, 119, 121, 130, 137). Zu den am häufigsten auftretenden Komplikationen gehören postoperative Infektionen in Form von Wundinfektionen, Pneumonie, Peritonitis und Sepsis, außerdem Nachblutungen, Herzkreislaufkomplikationen, Alkoholentzugssymptome und Multiorganversagen (2, 8, 110, 119, 120, 121, 137). Schon das einmonatige Absetzen von Alkohol vor einer Operation führt zu einer signifikanten Senkung der Komplikationsrate (118). In einem

Mausmodel wurden bereits nach sieben Tagen Ethanolapplikation Veränderungen der für die Immunabwehr zuständigen Leukozytenpopulationen nachgewiesen (123).

Laut der so genannten Translokationstheorie führt Alkoholkonsum zur Traumatisierung der Schleimhaut des oberen gastrointestinalen Traktes und zu einer erhöhten Permeabilität der Darmwand, was einen vermehrten Durchtritt von Toxinen verursacht (16). Parlesak et al. beobachteten in einer klinischen Studie eine 2-fache Erhöhung der Darmtranslokation von größeren Molekülen mit einem Molekulargewicht > 1200 Da und eine 5-fache Steigerung der Translokation von Endotoxin bei chronischen Alkoholkranken im Vergleich zu Nichtalkoholkranken (100). Napolitano et al. zeigten an einem Rattemodell eine erhöhte Endotoxintranslokation nach 14 Tagen oraler Ethanolgabe kombiniert mit einem Verbrennungstrauma (95). Mason et al. fanden zwar keine direkte Nachweise für eine alkoholinduzierte Erhöhung der Darmpermeabilität, maßen aber im Blut subakut alkoholapplizierter Ratten signifikant höhere Endotoxinwerte als in der Shamgruppe (80).

Bei Erforschungen an murinen Modellen, in vitro Systemen sowie in klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass sowohl der chronische als auch der akute Alkoholkonsum zu funktionellen Beeinträchtigungen von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Monozyten/Makrophagen führt (57, 128). Unter Ethanoleinfluss wurden die Zellzahlen von T-Lymphozyten in zirkulierendem Blut, dem Thymus und der Milz verringert sowie die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von Lymphozyten unterdrückt (33, 59). Ethanol induzierte in vitro bei Thymozyten höhere Apoptosezahlen im Vergleich zu Kontrollzellkulturen (34). Lymphozyten chronischer Alkoholkranken exprimierten weniger MHC II (128). Alkohol spielt eine große Rolle bei der Zytokinexpression, indem er die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und einigen anderen Zytokinen beeinflusst (32, 127, 128).

Laut des gegenwärtigen Forschungsstandes kann Alkoholkonsum also auf unterschiedliche Weise die Immunantwort des Körpers auf eindringende Erreger beeinträchtigen.

## **1.2 Operativer Stress**

Traumata bzw. operativer Stress lösen tiefgreifende Veränderungen des Immunsystems aus.

Bei einer klinischen Studie wurden nach einem Trauma erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  gemessen (4). Hensler et al.

zeigten bei chirurgischen Patienten wiederum eine gesenkte Produktion von TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-2 in der frühen postoperativen Phase, in späteren Phasen erhöhte sich die Produktion allerdings verglichen mit Normalwerten (51). In einer klinischen Studie, die sich mit Langzeit-Alkoholkranken befasste, wurden von Spies et al. postoperativ eine signifikante Senkung der IFN $\gamma$  / IL-10-Ratio sowie eine Suppression der Ratio zytotoxischer T-Lymphozyten (Tc1 / Tc2) beobachtet, wobei die Th1 / Th2 Ratio bei chronischen Alkoholkranken bereits vor dem operativen Eingriff gesenkt war (121). Einige tierexperimentelle Studien wiesen ebenfalls eine verminderte Produktion der Th1-Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-2) und eine Erhöhung der Sekretion des Th2-Zytokins IL-10 gemessen in einem Zeitraum von 2 Stunden bis 5 Tagen nach einem simulierten chirurgischen Trauma nach (5, 145). Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Lymphozytensuppression mit dem Umfang des chirurgischen Eingriffes zusammenhängt (4, 20). Außerdem kann in Folge einer starken Immunantwort nach einem operativen Eingriff eine Immunparalyse der T-zellvermittelten Immunität induziert werden (4). Kawasaki et al. zeigten eine schwächere TNF $\alpha$ -Antwort und eine gestiegene IL-10-Produktion nach LPS-Stimulus bei operativen Patienten (64). Lemaire et al. beobachtete nach einem minimal invasiven Eingriff ebenfalls eine verminderte LPS-induzierte Produktion von TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  (73). Brune et al. stellten bei den konventionell operierten Patienten eine Senkung der TNF $\alpha$ -, IFN $\gamma$ - und IL-2-Produktion fest (20). Eine Verminderung der Th1-Antwort und dementsprechend IFN $\gamma$ - und IL-2-Expression wurde bei Patienten nach Herzoperationen nachgewiesen (78). Operativer oder traumatischer Stress hat ebenfalls Auswirkungen auf die intestinale Translokation der Endotoxine. Schietroma et al. beobachteten in einer klinischen Studie eine eindeutige Erhöhung der Permeabilität der Darmwand nach einem laparotomischen Eingriff im Vergleich zu laparoskopisch operierten Patienten (111).

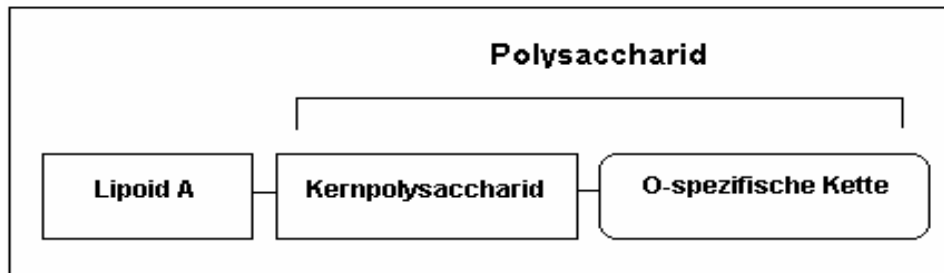
Nach aktuellem Forschungsstand können also operativer Stress oder ein Trauma immunmodulierend überwiegend im Sinne einer Hemmung des Immunsystems wirken.

### **1.3 LPS**

Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) ist eines der Hauptkomponenten der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Die Freisetzung von LPS durch die Lyse der Bakterien gilt neben anderen Mechanismen als mitverantwortlich für die systemischen

Reaktionen bei den von Gram-negativen Bakterien verursachten schweren Infektionen (112).

LPS ist ein amphiphiles Molekül, das aus zwei miteinander kovalent verbundenen Teilen besteht: aus einem für die toxische Wirkung verantwortlichen hydrophoben Lipidfragment („Lipoid A“) und einem hydrophilen Polysaccharidfragment, das in die Kern-Region und die hochvariable O-spezifische Kette zergliedert wird (106).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Endotoxin-Moleküls**

Bei der LPS-induzierten Zellaktivierung sind mehrere Faktoren beteiligt. Von zentraler Bedeutung sind dabei das LPS-bindende Serumprotein LBP, das zellständige Glykoprotein CD14, der Transmembranvermittler TIR-4 (Toll-like-receptor 4) und der Transskriptionsfaktor NF-kappa B (6, 35, 142).

LPS bewirkt einige Veränderungen bei verschiedenen Zelltypen:

LPS regt sowohl humane als auch murine T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokin-Sekretion an (89). Die T-Zell-Aktivierung wird durch eine Interaktion zwischen dem Rezeptor CD28 und/oder CTLA-4 auf Lymphozyten und ihren Liganden CD80 und/oder CD 86 auf den akzessorischen Monozyten realisiert (82).

Menschliche B-Lymphozyten reagieren nicht auf LPS, bei murinen B-Lymphozyten wird dagegen durch Endotoxin Proliferation und Antikörper-Sekretion induziert (38, 148).

LPS führt bei den CD3-, CD56-natürlichen Killerzellen zu Vermehrung und Expansion (39).

Unter dem LPS-Stimulus setzen Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen Entzündungsmediatoren frei, unter anderem  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IL-12}$  (22, 23, 69).

LPS gehört also zu den stärksten Aktivatoren des Immunsystems, indem es die Abwehrmechanismen anregt, die für eine effektive Immunantwort entscheidend sind.



## 1.4 T-Lymphozyten

### 1.4.1 Einteilung und Aktivierung der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind vor allem für die erworbene (adaptive) Immunität zuständig. Wie alle Blutzellen entwickeln sich auch die T-Lymphozyten aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (1). Die Vorläufer der T-Lymphozyten migrieren in den Thymus, wo sie zu Subpopulationen differenziert werden: CD4 T-Helfer-Zellen und CD8 T-Zellen (zytotoxische T-Zellen), wobei CD (engl.: cluster of differentiation) eine Vielzahl immunologisch relevanter Oberflächenglykoproteine („cluster“) darstellt, die nach einer konventionellen internationalen Nomenklatur aufgrund ihrer Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern nummeriert werden (1, 70). Nach dem Verlassen des Thymus zirkulieren die T-Zellen zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques (56).

Die T-Zellen erkennen nicht die freien Antigene, sondern ausschließlich die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC von engl.: major histocompatibility complex) gebundenen antigenen Peptide (14).

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen.

Die MHC-Molekülen-Klasse-I werden auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Wirbeltierzellen exprimiert und präsentieren hauptsächlich intrazelluläre Antigene viraler Herkunft. Komplexe aus Peptiden und MHC-I-Molekülen werden von CD8 T-Zellen erkannt (56).

MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APZ) - Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten - exprimiert. Auf APZ werden in der Regel Peptide von extrazellulären, durch Phagozytose aufgenommene Antigene durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert, die dann von CD4 T-Helfer-Zellen erkannt werden (56).

Die Antigenerkennung aller T-Zellen erfolgt über die Bindung des Peptid-MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex, außerdem binden sich die Co-Rezeptormoleküle CD4 oder CD8 an das entsprechende MHC-Molekül (56).

Die aktivierten T-Zellen üben dann unterschiedliche Effektorfunktionen aus, die im Folgenden näher beschrieben werden.

## 1.4.2 CD4 T-Lymphozyten

Aufgrund der sezernierten Zytokine mit unterschiedlichen Funktionen werden CD4 Th-Zellen in zwei Klassen eingeteilt.

Th1-Zellen exprimieren hauptsächlich IFN $\gamma$ , TNF $\beta$  und IL-2. Typisch für Th2-Zellen ist die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-3 werden sowohl von Th1- als auch Th2-Zellen gebildet (92, 93).

*Zellen der Th1-Klasse* spielen eine große Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, wie Viren, intrazellulären Bakterien und anderen Parasiten. Th1-Zellen sind wichtig bei DTH (engl.: delayed type hypersensitivity) -Reaktionen und wirken bei der für Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungskrankheiten charakteristischen Gewebeschädigung mit (56). Th1-Zellen erhöhen die inflammatorische Fähigkeit der antigenpräsentierenden Makrophagen, indem sie über Sekretion von IFN $\gamma$  Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-12 anregen (40, 131). Das von Makrophagen produzierte IL-12 stimuliert wiederum die IFN $\gamma$  Produktion der Th1-Zellen (40).

*Th2-Zellen* sind für die Bekämpfung extrazellulärer Erreger notwendig. Sie bewirken die Proliferation von B-Lymphozyten und deren Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (101). Th2-Zellen unterstützen die Eosinophilen und Mastzellen bei deren Wachstum, Differenzierung und Aktivierung (56). Sie gehören aber auch zu den pathogenetischen Faktoren allergischer Erkrankungen (56).

## 1.4.3 CD8 T-Lymphozyten

CD8 T-Zellen – die so genannten zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) – lysieren über verschiedene Mechanismen Zellen, die über MHC-I die entsprechenden Antigene präsentieren. Hauptsächlich sind dafür das zytotoxische Protein Perforin und Granzyme zuständig, die nach Bindung der aktivierten CD8 T-Lymphozyten an die Zielzelle in den Interzellulärspalt sezerniert werden (61, 62). Perforin führt durch Bildung unselektiver Kanäle in der Zytoplasmamembran zu Störungen des osmotischen Druckes der Zelle und folglich zum Tod. Granzyme werden nach dem Eindringen in die Zielzelle aktiviert und regen die Kaspasenkaskade an, was die Apoptose der Zelle hervorruft (61). Die Induktion der Kaspasen wird ebenfalls durch die Bindung des zu den TNF-Rezeptoren gehörenden Moleküls Fas an Fas-Ligand auf ZTL ausgelöst (62). Schließlich

produzieren die zytotoxischen CD8 T-Zellen die Zytokine TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, deren Wirkungen vielfältig in das spezifische und unspezifische Immunsystem eingreifen (49, 109).

#### **1.4.4 Auswirkungen von Alkohol und operativem Stress auf T-Zellen**

Sowohl tierexperimentelle als auch klinische Studien liefern Hinweise, dass Alkohol die T-Lymphozytenfunktion beeinträchtigt, was zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt. Nach Alkoholapplikation wird eine verminderte Immunantwort der Th1-Helferzellen beschrieben, wobei die Th2-Zellenfraktion entweder eine unveränderte oder gar erhöhte Funktion aufwies (72, 123, 138). In einer klinischen Studie wurde von Spies et al. ebenfalls eine Verminderung der Th1 / Th2 Ratio bei chronischen Alkoholkranken gegenüber Nicht-Alkoholkranken festgestellt (121). Greiffenstein et al. wiesen verminderte TNF $\alpha$ -Werte in Milz T-Lymphozyten von Ratten nach, denen über drei Tage Alkohol appliziert wurde (44). Zahlreiche Forscher beschreiben eine Verminderung der Th1-Antwort und der IFN $\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten bei akuten und chronischen Alkoholapplikationen (24, 41, 72, 123, 127, 138). Bei einer tierexperimentellen Studie wurde eine gesenkte Anzahl der CD4 und CD8 T-Zellen sowie eine erhöhte CD4 / CD8 Ratio in Folge von Alkoholapplikationen nachgewiesen (108). Jerrells et al. beobachteten eine Reduzierung der Milz T-Zellenpopulation bei einer alkoholhaltigen Diät bei Mäusen (59).

Auch in Folge von traumatischem bzw. operativem Stress kommt es zu Änderungen der Immunantwort der T-Lymphozyten. Nach experimentell induziertem Trauma mit Blutverlust konnte in der frühen postoperativen Phase eine supprimierte Sekretion der Th1-Zytokine IFN $\gamma$  und IL-2 gemessen werden (4). Ebenfalls wurde in einigen klinischen Studien eine nach größeren Verletzungen bzw. operativen Eingriffen verringerte Th1-Antwort registriert (20, 78). Ergebnisse einer Studie an Patienten mit schweren Verbrennungen zeigten eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion von den CD8 T-Lymphozyten in den ersten sieben Tagen nach dem Trauma (144). Spies et al. beobachteten eine postoperative Suppression der Tc1 / Tc2-Ratio bei chronischen Alkoholkranken (121).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Alkohol und operativer Stress sowohl einzeln als auch gemeinsam immunmodulierend wirken können, indem die Differenzierung zu

einzelnen T-Zellpopulationen beeinflusst und dadurch die Immunabwehr beeinträchtigt werden können.

## 1.5 Tumornekrosefaktor alpha

Humanes TNF $\alpha$  ist ein Homotrimer mit einem molekularen Gewicht von 51 kDa (56, 129). TNF $\alpha$  gehört zu der Gruppe der proinflammatorischen (entzündungsinduzierenden) Zytokinen.

Mittlerweile sind noch 15 weiteren Zytokine entdeckt, die zu der TNF-Familie gehören, wie zum Beispiel Lymphotoxin- $\alpha$  /  $\beta$ , FasL, Trail (125, 129). TNF $\alpha$  wurde ursprünglich als ein durch Endotoxin induzierter Serum-Faktor identifiziert, der bei Mäusen Nekrose von transplantierten Tumoren hervorrief und in vitro Nekrosen von neoplastischen Zell-Linien auslöste (21).

TNF $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten nach Antigenkontakt ausgeschüttet, was für die Initiierung der unspezifischen Immunantwort entscheidend ist (68). TNF $\alpha$  wird ebenfalls von CD4 T-Lymphozyten (Th1 und Th2) sowie CD8 zytotoxischen Zellen als Antwort auf Entzündung, Infektion und Traumata exprimiert (92, 93). Außerdem sind Keratinozyten, Fibroblasten und einige andere Zellen zur TNF $\alpha$ -Produktion fähig (9).

TNF vermittelt seine Funktionen über zwei verschiedene Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2 (74). TNF-R1 wird mit Ausnahme von Erythrozyten beinahe ubiquitär exprimiert, weswegen die meisten Zelltypen zumindest geringfügig TNF $\alpha$ -sensitiv sind, was das breite Wirkungsspektrum dieses Zytokins erklärt. TNF-R2 wird überwiegend in Zellen des Immunsystems exprimiert (113).

Der TNF-R1 ist für die meisten durch TNF $\alpha$  hervorgerufenen Prozesse verantwortlich. So ist zum Beispiel die apoptotische Wirkung von TNF $\alpha$  bei dem von CD8 T-Lymphozyten ausgelösten aktivierungsinduzierten Zelltod von Bedeutung (126, 146).

Außerdem wird von TNF $\alpha$  die Expression der Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen und Keratinozyten stimuliert und die Ausschüttung von IL-1, IL-6 und IL-12 induziert (98). TNF $\alpha$  wirkt synergistisch mit IL-6 als Aktivator der Akut-Phase-Proteine (Fibrinogen, CRP, Leukozyten-Elastase) und der Komplementkaskade (17, 99).

Der TNF-R2 ist für die Signalübertragung von zellgebundenem TNF $\alpha$  verantwortlich (11). In einigen Zelltypen kann die Stimulation des TNF-R2 ebenfalls den programmierten Zelltod induzieren (45).

Außerdem spielt TNF $\alpha$  bei der Entwicklung eines septischen Schocks eine wichtige Rolle (79, 135). In einer tierexperimentellen Studie wurde durch die Behandlung septischer Tiere mit TNF $\alpha$ -Antikörper eine Senkung der Mortalität erreicht (94). Beim Menschen brachte die TNF $\alpha$ -Therapie allerdings nicht den gewünschten Erfolg (105). Eine TNF $\alpha$ -Gentherapie führte ebenfalls zu Erhöhung der Überlebensrate bei Mäusen nach Pseudomonas-Applikation (27). Dagegen führte eine in vivo bei Mäusen ausgelöste Endotoxintoleranz zu einer verminderten TNF $\alpha$ -Antwort (140).

### **1.5.1 Effekte von Alkohol und Operation auf die TNF-alpha-Produktion**

Alkoholkonsum scheint eine vermindernde Auswirkung auf die TNF $\alpha$ -Expression zu haben, was zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems führen kann. Bei Ratten wurden nach hohen Alkoholdosen, die in einem kleinen Zeitraum appliziert wurden (Alcohol-binge-Modell), verminderte TNF $\alpha$ -Werte in der Milz gemessen (44). Nach akuter Alkoholgabe wurden jedoch bei Menschen keine Veränderungen der TNF $\alpha$ -Level im Serum beobachtet (32). Langzeitige Alkoholapplikation verursachte in Tiermodellen ebenfalls keine registrierbare TNF $\alpha$ -Produktionsänderungen (28, 31, 86).

Tierexperimentelle Studien und in vitro Untersuchungen von humanen Monozyten und Makrophagen zeigten eine Verminderung der TNF $\alpha$ -Sekretion unter Alkoholeinfluss bei Entzündung und Trauma (32, 66, 97).

## **1.6 Interferon gamma**

Das proinflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  ist ein Homodimer aus zwei identisch glykosylierten Polypeptidketten mit einer Größe zwischen 20 und 25 kDa (143).

Interferon wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann bei ihren Arbeiten an Hühnerembryonen entdeckt. Bei virusinfizierten Hühnerembryonen fanden sie in der

Chorioallantoismembran einen löslichen Faktor, der eine Hemmung der Vermehrung von Influenza A-Virus in Zellen auslöste (55). Außer IFN $\gamma$ , das ein temperatur- und säurelabiles Typ-II-Interferon ist, gibt es IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\tau$  und  $\omega$ , die zu den temperatur- und säurestabilen Typ-I-Interferonen gehören (124).

IFN $\gamma$  wird hauptsächlich von den aktivierten CD4 und CD8 T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) gebildet und freigesetzt (13, 36, 77, 91).

Der IFN $\gamma$ -Rezeptor wird nahezu bei allen kernhaltigen Zellen exprimiert (3, 7).

Zu den wichtigsten Funktionen dieses Zytokins gehört sein Einfluss auf die Differenzierung von CD4 T-Lymphozyten und auf die Th1-Immunantwort, indem IFN $\gamma$  die Entwicklung der Th1-Zellen aus Th0-Zellen und folglich die Th1-Antwort ermöglicht (29). In einem positiven Feedback-Mechanismus induziert IFN $\gamma$  einerseits eine verstärkte IL-12-Produktion von Makrophagen und andererseits eine erhöhte Expression der IL-12-Rezeptoren auf den Th1-Zellen, was eine starke Th1-Antwort gewährleistet (43, 132).

IFN $\gamma$  hat eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen, die zur Bildung von mikrobizid wirkenden Substanzen sowie von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffverbindungen induziert werden (96). Außerdem erhöht IFN $\gamma$  die Expression der Klasse II-MHC-Moleküle auf Makrophagen und den Zellen der myelomonozytären Reihe, was zu einer Aktivierung der spezifischen Immunantwort führt (53, 141).

IFN $\gamma$  verfügt über antiproliferative Eigenschaften, die bis zu zytotoxischen Wirkungen auf bestimmte Tumorzellen reichen (133).

### **1.6.1 Effekte von Alkohol und Operation auf die IFN-gamma-Produktion**

Es gibt sowohl tierexperimentelle als auch klinische Hinweise darauf, dass Alkohol die Ausbildung einer adäquaten IFN $\gamma$ -Produktion der T-Zellen beeinträchtigt (123,138). Milzzellen aus Mäusen, die Alkohol erhielten, produzieren in vitro 67-90% weniger IFN $\gamma$  (24). In einem Mausmodell wurde bei zwei Wochen lang ethanolapplizierten Tieren mit Pneumonie eine Senkung des IFN $\gamma$ -Spiegels beobachtet, was mit einer verminderten Überlebensrate korrelierte (147). In einer anderen tierexperimentellen Studie wurde die

pulmonale Abwehr gegen *K. pneumoniae* bei alkoholbehandelten Ratten mit Hilfe von IFN $\gamma$ -Gentherapie signifikant verstärkt (67).

Auch Traumata und chirurgische Eingriffe führen zu einer Suppression der IFN $\gamma$ -Produktion, welches sowohl experimentell als auch klinisch nachgewiesen werden konnte (4, 51, 121, 145).

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach dem in der Einleitung vorgestellten aktuellen Forschungsstand lässt sich das Folgende zusammenfassen:

- bei chirurgisch behandelten chronischen Alkoholkranken treten infektiöse postoperative Komplikationen (Wundinfektionen, Pneumonie, Peritonitis, Sepsis) häufiger auf (2, 8, 58, 119, 137);
- Alkohol beeinträchtigt das Immunsystem, indem er die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und einigen anderen Zytokinen beeinflusst (32, 127, 128);
- bei zahlreichen klinischen und tierexperimentellen Studien wurden tiefgreifende Veränderungen des Immunsystems in Folge von chirurgischen Eingriffen und Traumata registriert (4, 5, 51, 121);
- Lipopolysaccharid (LPS), das durch die Lyse der Gram-negativen Bakterien freigesetzt wird, ist einer der stärksten Immunaktivatoren (22, 23, 38, 39, 69, 83, 89);
- die von CD4 und CD8 T-Lymphozyten produzierten Zytokine TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$  werden von Alkohol, operativem bzw. traumatischen Stress und LPS beeinflusst (4, 32, 51, 89, 121, 127, 128).

Daher wurde **das primäre Ziel** dieser Studie wie folgt gesetzt:

Erforschung der immunsupprimierenden Mechanismen des Alkohols an einem operativen Mausmodell bei einer LPS-induzierten Endotoxinämie anhand einer durchflusszytometrischen Untersuchung der TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 Milz T-Lymphozyten.

Demzufolge ergaben sich für diese Arbeit die folgenden Fragen:

1. Wirkt Alkohol bei operierten Tieren supprimierend auf die TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden Milz CD4 und CD8 T-Lymphozyten?
2. Wie wirkt eine Kombination von Alkohol und LPS auf die TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden Milz CD4 T-Lymphozyten und CD8 zytotoxischen T-Zellen?

Zu den **sekundären Zielen** dieser Studie gehören:

- Untersuchung der Auswirkungen einer LPS-Applikation auf die TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden Milz CD4 und CD8 T-Lymphozyten.
- Erforschung des Einflusses von Alkohol, LPS und der Kombination von diesen beiden Faktoren auf den klinischen Zustand der Tiere.
- Histologische Untersuchung der Auswirkungen von Alkohol auf Leber sowie einer LPS-induzierten Endotoxinämie auf das Milzgewebe.

## 3 Methoden

### 3.1 Tierversuche

#### 3.1.1 Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden weibliche Balb/c-Mäuse verwendet, die auf der Zuchtstation Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet wurden. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere zwischen acht und zwölf Wochen alt. Nach der Anlieferung wurden die Mäuse eine



Woche zur Adaptation in Gruppen zu max. je neun Tieren auf Makrolon-Käfige verteilt. Sie wurden tierschutzgerecht in einem klimatisierten Raum (Temperatur 27°C ((25±2)°C), relative Luftfeuchte 52% ((55±5)%), mit kontinuierlichem Licht/ Dunkel-Wechsel (zwölf stündlich) mit Standardtrockenfutter und Wasser ad libitum in SPF-Käfigen gehalten. Die gesamten Arbeiten im Ablauf der Tierversuche wurden ausschließlich in Lamina Flow Werkbänken ausgeführt.

Die Balb/c-Mausmodelle sind seit Jahren in der Alkohol- und Infektionsforschung sowie beim Durchführen chirurgischer Eingriffe etabliert (10, 63, 71, 116, 123).

Der Tierversuchsantrag mit dem Aktenkennzeichen G0271/00 wurde am 09.04.2001 behördlich bewilligt.

### **3.1.2 Markierung**

Zur Identifikation der Mäuse in einem Käfig wurden die Tiere am Rücken mit roten, blauen und grünen wasserfesten Markern gekennzeichnet.

### **3.1.3 Gruppeneinteilung**

Um die Effekte von Alkohol bei operativen Eingriffen auf das Immunsystem und auf die Entwicklung postoperative Infektionen zu untersuchen, wurden unten dargestellte Versuchsgruppen (A-IV bis B-IV) mit 4-6 Tieren pro Gruppe gebildet. Bei Mäusen aller fünf Gruppen wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Die Gruppe A-IV ist die Shamgruppe, deren Mäuse lediglich operiert wurden. Der Gruppe A-V wurde isotone Kochsalz-Lösung (NaCl) intraperitoneal appliziert. Die A-VI Gruppe erhielt intraperitoneale Ethanol-Injektionen. Bei den Tieren der Gruppen B-III und B-IV wurde nach der NaCl- bzw. Ethanolapplikation mittels LPS-Injektion eine Endotoxämie induziert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht es, ein detailliertes Bild der Auswirkung der einzelnen Parameter bzw. ihrer Kombinationen zu erhalten. Beim Vergleich der Shamgruppe zu den A-V und A-VI Gruppen sind die Auswirkungen vom täglichen Stichtrauma beurteilbar. Die Gegenüberstellung von A-V und A-VI Gruppen lässt die Einflüsse von Alkohol abschätzen. Beim Vergleichen der Gruppen A-V vs. B-III und A-VI vs. B-IV können die Wirkungen von LPS erkennbar werden. Die miteinander verglichenen B-III und B-IV Gruppen lassen die Effekte einer kombinierten Alkohol-LPS-Behandlung beurteilen.

A-IV:	unbehandelte Kontrolltiere	+ OP
A-V:	NaCl i.p. behandelte Kontrolltiere	+ OP
A-VI:	Ethanol i.p. behandelte Tiere	+ OP
B-III:	NaCl i.p. + LPS i.p. behandelte Tiere	+ OP
B-IV:	Ethanol i.p. + LPS i.p. behandelte Tiere	+ OP

### 3.1.4 Gesamter Verlauf der Tierversuche

1.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	Gewichtskontrolle
2.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
3.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
4.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
5.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
6. Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
7.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	
8.Tag	NaCl bzw. Alkohol ip.	Gewichtskontrolle; OP; Erhebung der klinischen Zeichen
9.Tag	Keine Injektion	Gewichtskontrolle; Erhebung der klinischen Zeichen
10.Tag	Keine Injektion	Gewichtskontrolle; Erhebung der klinischen Zeichen; LPS-Gabe
11.Tag	Keine Injektion	Gewichtskontrolle; Erhebung der klinischen Zeichen; Tötung; Blutabnahme; Entnahme der Organe

**Tabelle 1: Gesamtes Verlaufsschema der Tierversuche**

### 3.1.5 Injektionen

Die Applikation von NaCl bzw. Ethanol erfolgte über acht Tage 1-mal täglich, intraperitoneal (81).

Die NaCl-applikation wurde bei den Gruppen A-V und B-III durchgeführt. Die tägliche Injektionsdosis betrug 1ml Lösung.

Der Alkohol wurde den Gruppen A-VI und B-IV appliziert. Jedes Tier bekam täglich 3 g Alkohol pro kg Körpergewicht, gelöst in isotoner NaCl-Lösung, so dass das gesamte Injektionsvolumen 1ml betrug (81). Das Verabreichen von Ethanol in dieser Menge über acht Tage entspricht einer subchronischen Alkoholexposition und führt zu keinen Leber-

oder anderen Organschäden, wodurch andere immunmodulatorische Auswirkungen ausgeschlossen werden konnten (59, 87, 123).

### **3.1.6 Operation**

#### **3.1.6.1 Anästhesie**

Am achten Tag wurde bei den Tieren eine mediane Laparotomie durchgeführt. Die Anästhesie für diese Operation ist unter Verwendung von Isofluran mit dem Narkosegerät Sulla 800V ausgeführt worden. Die Narkose wurde bei 1 L/min Sauerstoff und 4% Isofluran eingeleitet. Die Maus wurde hierzu mit dem Kopf in eine abgeschnittene 20ml Spritze, die als Beatmungsmaske diente, gehalten, durch die das Gasgemisch strömte. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht wurde, wurde die Maus, um eine Hypothermie zu vermeiden, auf einem warmen Coolpack in Rückenlage mit Pflasterstreifen fixiert. Auf die Augen der Maus wurde vorsichtig die Panthenol-Augensalbe appliziert, um einen Schaden der Hornhaut durch den Gasstrom zu vermeiden. Während der OP wurde die Narkose mit 0,9 L/min eines 1,5-2,5% Isofluran-Sauerstoffgemisches aufrechterhalten.

#### **3.1.6.2 Mediane Laparotomie**

Nach Rasur und Desinfektion erfolgte eine mediane Laparotomie vom mittleren Unterbauch 1,5-2cm nach cranial (19). Nach Mobilisation des linken Leberlappens wurde das Peritoneum in fortlaufender Maschennaht und die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Wunde wurde mit einem Sprühverband versorgt. Der gesamte operative Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Abschluss des Eingriffs wurde die Narkose beendet, und das Tier ist bis zum vollständigen Aufwachen überwacht worden. Um einer metabolischen Entgleisung vorzubeugen wurde zusätzlich eine 5%-Glukose Lösung zum Trinken angeboten (63).

#### **3.1.7 LPS-Applikation**

Zur Induktion der Endotoxinämie bekam jede Maus der Gruppen B-III und B-IV am zweiten postoperativen Tag 24 Stunden vor der Isolation der Zellen eine intraperitoneale Injektion von 25µg LPS 026:B6 gelöst in 1ml NaCl (90).

### **3.1.8 Erhebung der klinischen Zeichen**

Um die Veränderungen des Körpergewichts im Verlaufe des Versuchs zu verfolgen, wurden die Mäuse insgesamt 5-mal gewogen: am ersten Injektionstag (ausgenommen die A-IV Gruppe, bei der keine NaCl- bzw. Alkoholapplikation erfolgte), am OP-Tag, an den zwei postoperativen Tagen und am Tag der Tötung.

Der Zustand der Tiere wurde am Tag der Operation unmittelbar vor dem Eingriff, an den zwei postoperativen Tagen und am Tag der Tötung anhand klinischer Zeichen mittels eines Drei-Punkte-Scores erhoben. Dazu wurden folgende Parameter herangezogen:

- Motorische Aktivität (0-normal, 1-verlangsamt, 2-passiv, abgeschlagen)
- Sekretion aus Augen, Nase, Vagina und After (0-unauffällig, 1-ermehrte, 2-starke)
- Zustand des Fells (0-keine Piloerektion, 1-leichte bis mittlere Piloerektion, 2-struppiges Fell).

### **3.1.9 Euthanasie und Entnahme der Organe**

Die Tötung erfolgte durch eine intraperitoneal applizierte Überdosis Ketamin (Curamed) (250mg/kg) + Midazolam (Dormicum, Hoffmann-La Roche) (10mg/kg) gefolgt von einem Genickbruch. Nachdem ein Ausfallen des Zwischenzehenreflexes festgestellt worden war, wurden die Mäuse auf einer Korkplatte aufgespannt. Es folgte eine gründliche Desinfektion, bevor sie unter einer Lamina Flow Arbeitsbank präpariert wurden.

Die Haut wurde median von den hinteren Beinen bis zur Mandibula durchgetrennt und vom Peritoneum abgelöst. Danach wurde das Peritoneum bis zum Diaphragma eröffnet und entfernt, das Diaphragma durchgestochen, der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt.

Anschließend wurden die Milz und die Leber entnommen, die Milz wurde von dem beiliegendem Pankreasgewebe befreit und in ein RPMI 1640 Medium enthaltendes 8ml Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt.

### **3.1.10 Histopathologische Untersuchung**

Zur Kontrolle der Wirkung von Alkohol auf Lebergewebe wurden histologische Schnitte der Leber von den Mäusen der Shamgruppe und mit Alkohol behandelten Mäusen angefertigt und mikroskopisch untersucht.

Um die Folgen der LPS-indizierten Endotoxinämie zu beurteilen, wurden histologische Schnitte von Milzen der Tiere von allen fünf Behandlungsgruppen hergestellt.

Die Leber und die Milz wurden zur histopathologischen Untersuchung in 10%igem, neutral-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Aus den fixierten Organen wurden Schnitte angefertigt, nach Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Die Herstellung und Auswertung der Präparate wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité, Campus Mitte, unter Leitung von Dr. Lars Morawietz durchgeführt.

### **3.1.11 Blutalkoholbestimmung**

Zur Bestimmung des Alkoholspiegels im Blut wurde die Headspace-Methode verwendet. Das Blut wurde ca. eine Stunde nach Alkoholinjektion bei der Präparation retrobulbär und aus der Vena porta entnommen. 100 µl Blut wurden in eine Headspace-Probeflasche pipettiert, dazu war 500 µl von internem Standard (0,2 mg/g tert-Butanol-Lösung) gegeben worden. Anschließend wurden die Probenflaschen in den Autosampler platziert, und die Alkoholkonzentration nach Gebrauchsanleitung des Herstellers gaschromatografisch gemessen. Der Messung wurde bei vier Mäusen durchgeführt und pro Probe 2fach wiederholt.

Die Alkoholbestimmung wurde in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin, Charité Berlin, Campus Mitte, unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. F. Pragst in der Abteilung für Toxikologische Chemie durchgeführt.

## 3.2 Durchflusszytometrie der CD4 und CD8 T- Zellen

### 3.2.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence Activated Cell Separation) ist eine Methode zur Charakterisierung von Fluoreszenz-markierten Einzelzellen unter Berücksichtigung der Zellgröße, der Granularität sowie der Fähigkeit, bestimmte Oberflächenrezeptoren und intrazelluläre Substanzen zu exprimieren. Vor der durchflusszytometrischen Analyse werden die zu untersuchenden Zellen mit zuvor an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern inkubiert, die für die jeweiligen Proteine (Differenzierungsantigenen (cluster of differentiation, CD) der Zelloberfläche von Leukozyten bzw. intrazelluläre Moleküle) spezifisch sind.

Ein Durchflußzytometer besteht aus 3 Komponenten: Flüssigkeitssystem, Optisches System und Detektionssystem (103, 114).

Beim *Flüssigkeitssystem* handelt es sich um ein Schlauchsystem, über das die Partikelsuspension aus einem Proberöhrchen mittels Überdrucks in den Messbereich geleitet wird. Durch trichterartige Verengung erfolgt eine hydrodynamische Fokussierung, so dass die Zellen in der Messküvette einzeln hintereinander von dem Laserstrahl erfasst werden können.

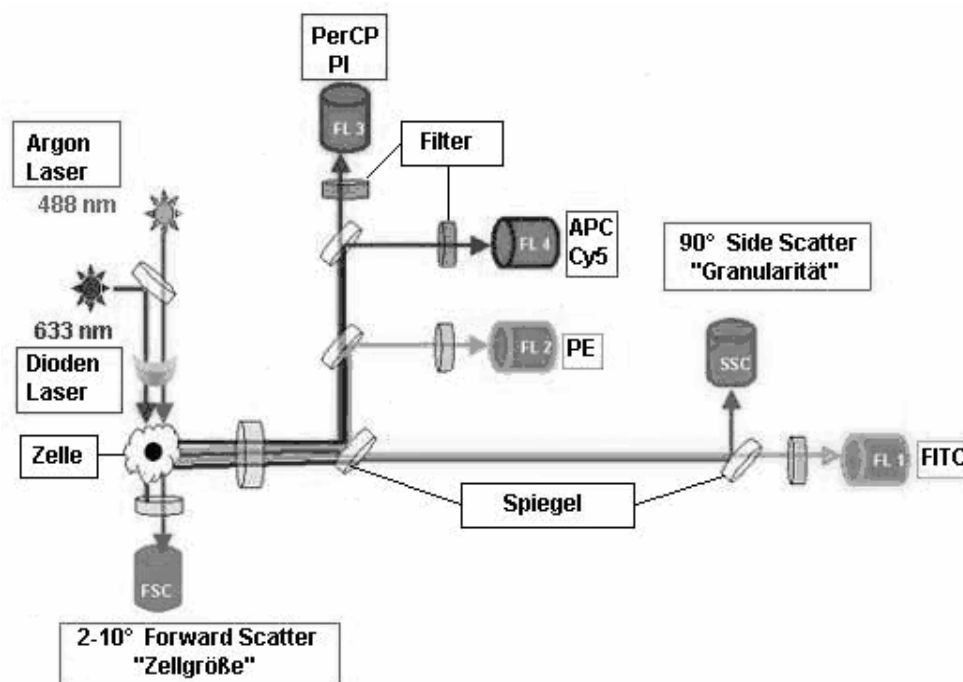
Das *optische System* besteht aus einem Argon-Laser (Wellenlänge 488nm) und einem Dioden-Laser (Wellenlänge 633nm). Das durch Linsen gebündelte und zentrierte Laserlicht trifft exakt die durchfließenden Zellen, wobei aufgrund der unterschiedlichen Größe und Oberfläche der Zellen die Laserstrahlen unterschiedlich gestreut werden (103, 114):

- Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC; 2-10° zu m einfallenden Licht), korreliert mit der Zellgröße.
- Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC; 90° zum einfallenden Licht), korreliert mit Oberflächenstruktur (Membranfaltung) und Granularität der Zelle.

Außerdem regt der Laserstrahl die oberflächlichen und intrazellulären Fluorochrome an, welche dadurch ein charakteristisches Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren.

Das emittierte Licht wird durch Filter- und Spiegelsysteme so aufgetrennt, dass letztlich weitere 4 Parameter detektiert werden können (12):

- Fluoreszenzintensität 1 (FL1; Filter 530/30 BP) - Messung der Emission von Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Das Emissionsmaximum von FITC beträgt 519nm.
- Fluoreszenzintensität 2 (FL2; Filter 585/42 BP) - Messung der Emission von R-Phycoerythrin (PE). PE hat ein Emissionsmaximum von 578nm.
- Fluoreszenzintensität 3 (FL3; Filter 670 LP) – Messung der Emission von Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) oder Propidiumiodid (PI), mit Emissionsmaxima von 675nm bzw. 617nm.
- Fluoreszenzintensität 4 (FL4; Filter 661/16 BP) – Messung der Emission von Allophycocyanin (APC) oder Indodicarbocyanin 5 (Cy5), die entsprechenden Emissionsmaximum-Werte betragen 660nm bzw. 670nm.



**Abbildung 3: das optische System von FACSCalibur; modifiziert**

Das System besteht aus Lasern (Argon, Dioden), Filtern, Spiegeln und Detektoren (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3, FL4) (149).

Das Detektionssystem eines Durchflußzytometers ermöglicht die Detektion der Lichtsignale von empfindlichen Lichtsensoren, wobei die FSC- und SSC-Signale linear und die Fluoreszenz-Signale logarithmisch verstärkt werden. Das von jeder Zelle gemessene analoge Messsignal wird dann mittels eines angeschlossenen Mac-

Rechners digitalisiert und mit Hilfe der „CELLQuest 3.3 Research Software“ (Becton Dickinson) ausgewertet. Die gemessenen Werte werden in ein zweiparametrisches Punktfeld-Diagramm (Dotplot) aufgetragen, in dem jede Zelle als ein Punkt erscheint. Bei jeder Messung wurden mindestens 30 000 der Zielzellen gespeichert und insgesamt 130 000 – 200 000 Ereignisse im manuell gesetzten Lymphozyten-Gate gemessen. Die Quadranten für die Analyse des Anteiles zytokinproduzierender Zellen werden an den Isotypenkontrollen ausgerichtet und in Prozentanteil der TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten bzw. zytotoxischen T-Zellen an den gesamten registrierten CD4 und CD8 Zellen dargestellt.

Beim Einsetzen mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe können sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome teilweise überlappen, d.h. in den Nachbarmessbereich hineinstrahlen und dort zum gemessenen Signal beitragen. Die Detektoren sollen daher so angepasst werden, dass bei jedem Messsignal der Emissionsanteil aus den anderen Kanälen abgezogen (kompensiert) wird. Zum Einstellen der Kompensation wurden negative (ungefärbte bzw. Isotypkontrollen) und einfach positive für jeden Kanal Zellen gemessen (103, 114).

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach Protokollen des Institutes für Medizinische Immunologie sowie des Deutschen Rheumaforschungszentrums (65, 85).

### **3.2.2 Isolierung der Leukozyten aus der Milz**

Um die Leukozyten aus der Milz zu isolieren, wurden die Milzen mittels eines Stempels durch ein Zellsieb (Porengröße 70 $\mu$ m) gedrückt, bis nur noch Bindegewebe übrig war. Die Zellen wurden mit ca. 5ml 10%-FBS-Medium gespült, dann mit ca. 20ml 1%-FBS-Medium bei 1300U/min, 4°C für 7min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 3ml Hämolysepuffer aufgenommen, damit die Erythrozyten lysiert werden. Nach einigen Minuten wurde der Lysepuffer mit 3 ml 10%-FBS-Medium abgestoppt, und die Zellsuspension wurde mit ca. 20ml 1%-FBS-Medium nochmals zentrifugiert (1300U/min, 4°C, 7min).

### **3.2.3 Zählen von Zellen**

Das Zellpellet wurde in 10ml 1%-FBS-Medium resuspendiert. Danach wurde 20 $\mu$ l Zellsuspension genommen, 80 $\mu$ l Trypanblaulösung dazugefügt (1:5), und die Zellen



sind in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt worden.

Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times Vf \times KF \times \text{Endvolumen}$$

$n$  = Anzahl der Zellen in einem großen Quadrant der Zählkammer (16 kleine Kästchen)

$Vf$  = Vorverdünnungsfaktor = 5

$KF$  = Kammerfaktor = 10 000

$\text{Endvolumen}$  = 10 ml

Nach dem Zentrifugieren (1300U/min, 4°C, 7min) wurde die Konzentration der Zellsuspension mit 10%-FBS-Medium auf  $2,5 \times 10^6$  Lymphozyten pro ml eingestellt. Von der angefertigten Einzelzellsuspension wurde in zwei 4ml FACS-Röhrchen jeweils 1ml pipetiert.

### 3.2.4 Stimulierung der Zellen

Zum Erreichen einer detektierbaren Zytokinproduktion müssen die zu untersuchenden Zellen zuvor eine Zeit lang *in vitro* unspezifisch mit wachstumsfördernden Substanzen stimuliert werden. Dafür wurden die Zellen für vier Stunden mit 2,5ng/ml Phorbolmyristat-Azetat (PMA) und 1µg/ml Ionomycin im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Beide Substanzen stimulieren die Protein-Kinase C (PKC) und regen auf diese Weise die Zellproliferation an. Die PKC wird *in vivo* durch Diacylglycerol (DAG) und  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert. PMA ist ein Phorbol-ester, der dem DAG ähnelt. Ionomycin ist ein Ionophor, das wegen seines hydrophoben Außenbereichs die Lipiddoppelschicht der Membran von Zellen und Organellen durchdringt und den zytosolischen Calciumspiegel erhöht.

Nach Ablauf von zwei Stunden wurde jeweils 5µg/ml Brefeldin A zugegeben. Brefeldin A bewirkt eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine, indem er durch Behinderung des Zusammensetzens der Hüllen am Endoplasmatischen Retikulum den nach außen gerichteten sekretorischen Vesikeltransport blockiert.

Danach wurde die Inkubation im Brutschrank für weitere zwei Stunden fortgesetzt.

Zur Kontrolle der Stimulation wurden zusätzliche Zellproben von den gleichen Tieren ohne PMA/Ionomycin-Zugabe gleichzeitig vier Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei nach der 2-stündigen Inkubation diesen Proben wie auch den Stimulierten Brefeldin A

zugegeben wurde. Bei dem weiteren Ablauf der zytometrischen Untersuchung wurden die stimulierten und die unstimulierten Proben vollkommen identisch behandelt.

### **3.2.5 Oberflächenfärbung**

Im Anschluss an die 4h Inkubation wurden die Proben mit FACS-Puffer PBA bei 1500U/min, 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Zugabe von jeweils 3ml PBA und erneutes Zentrifugieren gewaschen, um Mediumsreste vollständig zu entfernen.

Färbeantikörper können sich unspezifisch über ihre niedrig affine Fc-Fragmente an Fc-Rezeptoren anbinden, die auf vielen Zellarten vorhanden sind. Zur Erhöhung der Spezifität der Färbung wurden daher die Fc $\gamma$  III(CD16)- und II(CD32)-Rezeptoren mit ungefärbtem Anti-CD16/CD32-Antikörper (2 $\mu$ g pro Röhrchen, d.h. 4 $\mu$ l Fc-Block verdünnt mit 46 $\mu$ l PBA) für 9min auf Eis blockiert.

Die Oberflächenfärbung erfolgte mittels Zugabe von 0,2 $\mu$ g Anti-CD4-PE und 0,2 $\mu$ g Anti-CD8a-PerCP-Cy5.5 jeweils in jedes FACS-Röhrchen. Anschließend wurden die Proben für weitere 9min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Nach der Oberflächenfärbung wurde 3ml PBS dazu pipettiert, und die Proben wurden zentrifugiert (1500U/min, 4°C, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert. Als nächstes erfolgte die Fixierung der gefärbten Zellen, wofür den Zellen 1ml 4% Paraformaldehyd (PFA) zugegeben wurde, und die Proben für 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert wurden.

Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit 3ml PBA zentrifugiert (1500U/min, 4°C, 5 min), um die PFA-Reste vollständig zu entfernen.

### **3.2.6 Intrazelluläre Färbung**

Zur intrazellulären Färbung muss die Zellmembran permeabilisiert werden, damit der Antikörper in die Zelle diffundieren kann. Das kann durch Verwendung von Saponin erreicht werden, da Saponin ein pflanzlicher Wirkstoff ist, der eine permeabilisierende Fähigkeit besitzt. Die Zellen wurden daher mit 3ml Saponin-haltigem Wash/Perm (0,5% Saponin) für 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, dann wurden die Proben zentrifugiert, dekantiert und abgetupft.

Die Blockierung der unspezifischen Bindungen erfolgte analog der Blockierung bei Oberflächenfärbung (s. 3.2.5), für die Verdünnung des Fc-Blocks wurde jedoch 46µl Wash/Perm genommen.

Zum Einstellen der Parameter am Durchflusszytometer wurden Isotypen-Färbungen angewendet. Bei der Isotypen-Kontrolle wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, der an den unspezifischen Antikörper vom gleichen Ig-Isotyp des zu kontrollierenden Antikörpers gekoppelt war. Da von einer Milz zwei FACS-Röhrchen Einzelzellsuspension hergestellt wurde (s. 3.2.3), wurden die Zellen des einen Röhrchens spezifisch mit Anti-IFN $\gamma$ - und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern (0,5µg Anti-IFN $\gamma$ -FITC + 0,2µg Anti-TNF $\alpha$ -APC verdünnt mit 30µl Wash/Perm) und die Zellen des anderen Röhrchens unspezifisch mit Isotyp-Antikörpern (0,5µg IgG1-FITC + 0,2µg IgG1-APC verdünnt mit 30µl Wash/Perm) gefärbt. Nach einer 15min. dauernden Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurde zur Entfernung ungebundener Antikörper mit Wash/Perm zentrifugiert (1500U/min, 4°C, 5min), wobei der gebundene Antikörper-Komplex aufgrund seiner Größe nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren kann. Abschließend wurde, um geöffnete Poren zu verschließen, einmal mit PBA gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300µl PBA aufgenommen und am FACSCalibur analysiert.

### **3.2.7 Messung**

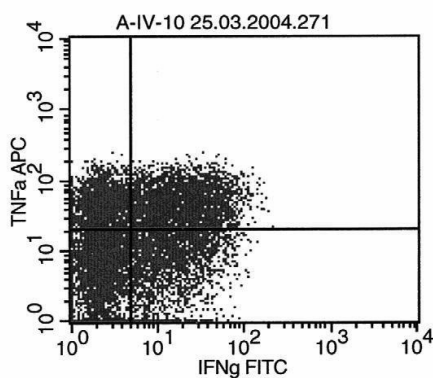
Die Durchflusszytometrie erfolgte an dem Gerät FACSCalibur „Waldorf und Statler“ in dem Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ). Die Messung wurde unmittelbar nach der intrazellulären Färbung durchgeführt. Nach dem Kompensieren der Laser mit der Verwendung von Einzelfärbungen wurden die gesamten Zellproben durchflusszytometrisch analysiert.

Die bei den durchflusszytometrischen Messungen detektierten Fluoreszenz-Lichtsignale sind in grafischer (Dotplots) und Zahlen-Form (Quadrantenstatistik) dargestellt.

In den Dotplots sind auf der X-Achse die IFN $\gamma$ -FITC- bzw. Iso-FITC-markierten und auf der Y-Achse die TNF $\alpha$ -APC- bzw. Iso-APC-markierten T-Zellen dargestellt.

Bei einer Quadrantenstatistik handelt es sich um Zahlenwerte (Eventzahl und prozentualer Anteil der Ziezzellen an den gesamten gemessenen CD4 bzw. CD8 positiven Zellen und an den gesamten detektierten Events), die auf 4 Quadranten des Dotplots bezogen berechnet sind. Die Quadranten haben die Bezeichnungen UL (upper

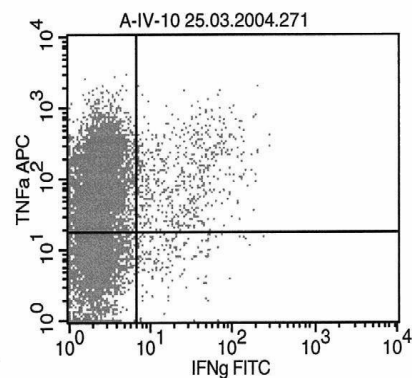
left), UR (upper right), LL (lower left) und LR (lower right), was auf Deutsch entsprechend oben links, oben rechts, unten links und unten rechts bedeutet. Die TNF $\alpha$ -produzierenden T-Lymphozyten sind in den Quadranten UL und UR dargestellt, und die IFN $\gamma$ -Produzierenden - in LR und UR. Demzufolge exprimieren die Zellen der UL- und LR-Quadranten nur eines der beiden gemessenen Zytokine – TNF $\alpha$  bzw. IFN $\gamma$  („nur TNF $\alpha$ “- und „nur IFN $\gamma$ “-Zellen), die T-Lymphozyten des UR-Quadrants produzieren jedoch sowohl TNF $\alpha$ , als auch IFN $\gamma$  („TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-Zellen). In dem LL-Quadrant sind unterschiedliche unspezifisch fluoreszierende sowie tote Zellen dargestellt, die für das Experiment keine Bedeutung haben und daher nicht bewertet wurden.



CD 8

File: A-IV-10 25.03.2004.271

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2294	17.99	1.58
UR	3544	27.79	2.45
LL	4189	32.84	2.89
LR	2727	21.38	1.88



CD 4

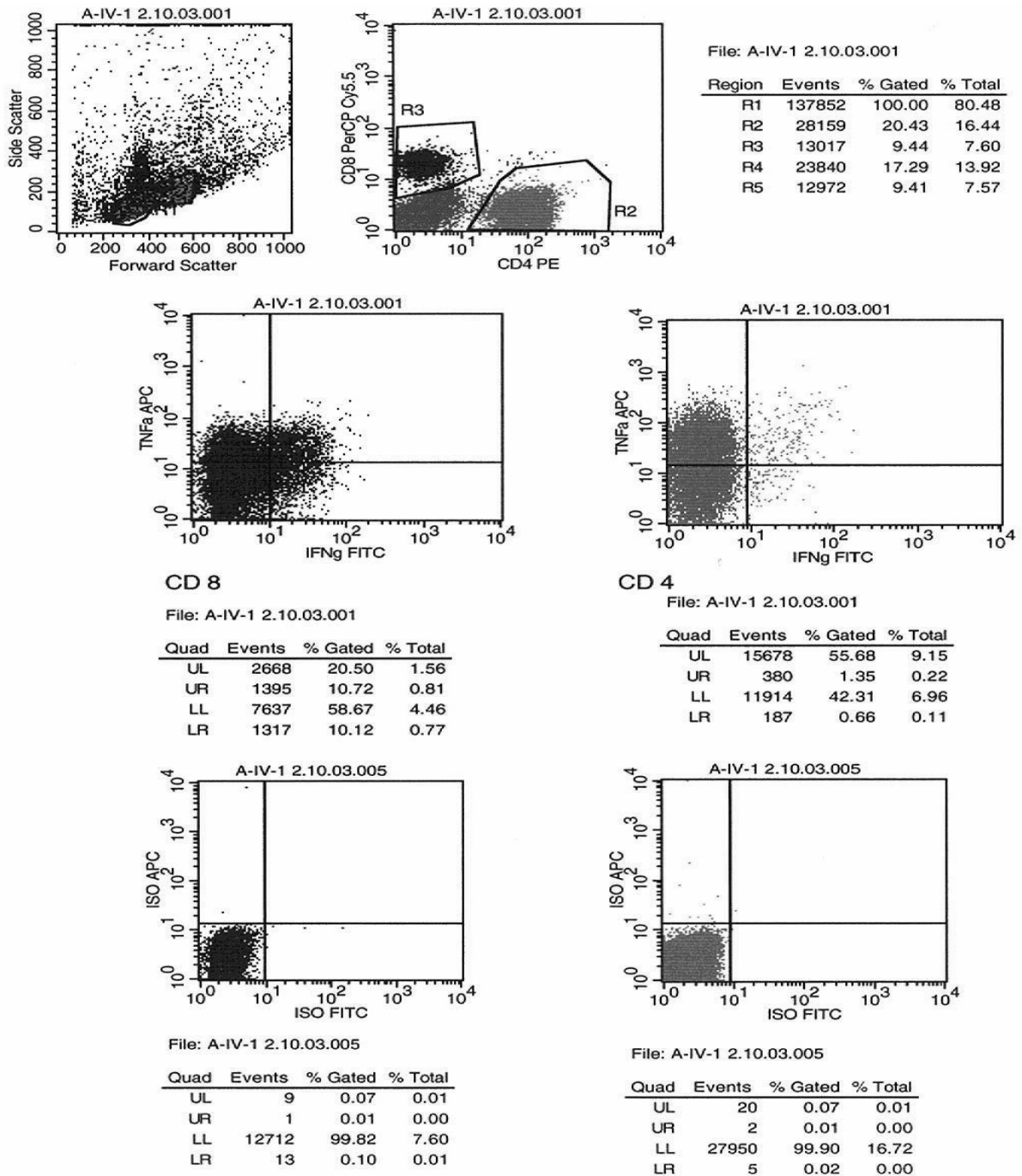
File: A-IV-10 25.03.2004.271

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	19565	67.92	13.52
UR	1196	4.15	0.83
LL	7754	26.92	5.36
LR	290	1.01	0.20

**Abbildung 4: Darstellung der durchflusszytometrisch untersuchten CD4 und CD8 T-Zellen**

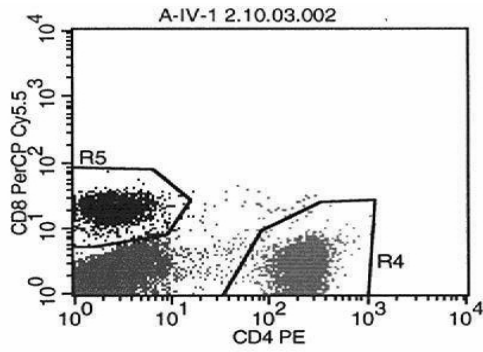
Die Abbildung zeigt die Dotplots und Quadrantenstatistik für die durchflusszytometrisch untersuchten TNF $\alpha$ -APC- und IFN $\gamma$ -FITC-markierten CD8 (links) und CD4 (rechts) Milz-T-Lymphozyten. In den Dotplots sind auf der X-Achse die IFN $\gamma$ -FITC-positiven und auf der Y-Achse die TNF $\alpha$ -APC-positiven Zellen dargestellt. Die Quadrantenstatistik zeigt die Eventzahl und den prozentualen Anteil von den registrierten Events an den gesamten gemessenen CD8 bzw. CD4 positiven Zellen (%Gated) und an den gesamten detektierten Zellen (%Total), die auf 4 Quadranten des Dotplots bezogen berechnet sind: UL („upper left“ - oben links), UR („upper right“- oben rechts), LL („lower left“ - unten links) und LR („lower right“ - unten rechts).

Da für die statistische Auswertung die prozentualen Anteile der TNF $\alpha$ - bzw. IFN $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten von den insgesamt registrierten CD4 und CD8 Zellen verwendet wurden, sind im Folgendem unter den durchflusszytometrisch gemessenen TNF $\alpha$ - bzw. IFN $\gamma$ -Produktionswerten die prozentualen Anteile der zuständigen Expressionszellen gemeint. Zur statistischen Analyse wurden von den TNF $\alpha$ - bzw. IFN $\gamma$ -Werten die entsprechenden Isotypen-Werte abgezogen.



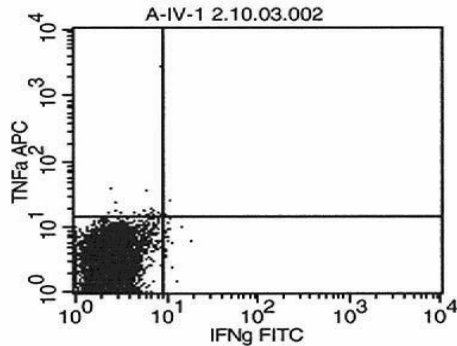
### Abbildung 5: FACS-Darstellung der PMA/Ionomycin-stimulierten CD4 und CD8 T-Zellen

Die Abbildung stellt die durchflusszytometrisch registrierten Signale von den mit PMA/Ionomycin stimulierten CD4 und CD8 Zellen in Form von Dotplots und Quadrantenstatistik dar. In dem linken obersten Dotplot sind die gesamten T-Lymphozyten abgegrenzt; in dem rechten obersten Dotplot sind in dem Gate R2 die PE-markierte CD4 Population der T-Lymphozyten und in dem Gate R3 – deren PerCP Cy 5.5-markierte CD8-Population eingefasst. In den restlichen Dotplots sind die Signale der Zellen (links der CD8- und rechts der CD4-Zellen) abgebildet, die mit TNF $\alpha$ -APC und IFN $\gamma$ -FITC (die zwei mittleren Dotplots) beziehungsweise Isotyp-APC und Isotyp-FITC (die zwei untersten Dotplots) markiert wurden. In den mittleren und unteren Dotplots sind auf der X-Achse die IFN $\gamma$ -FITC- bzw. Iso-FITC-positiven und auf der Y-Achse die TNF $\alpha$ -APC- bzw. Iso-APC-positiven Zellen dargestellt. Die Quadrantenstatistik zeigt die Eventzahl und den prozentualen Anteil von den registrierten Events an allen CD4 bzw. CD8 Zellen und an gesamten detektierten Zellen, die auf die R-Gates oder die 4 Quadranten der Dotplots bezogen berechnet sind (s. Abb. 4).



File: A-IV-1 2.10.03.002

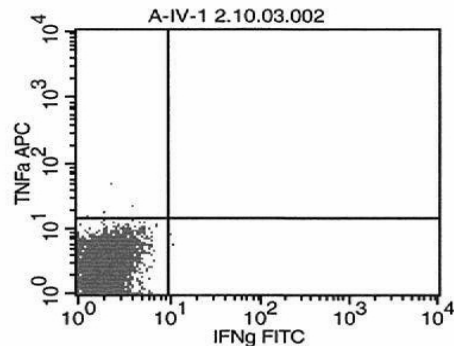
Region	Events	% Gated	% Total
R1	127070	100.00	83.87
R2	29810	23.46	19.68
R3	11738	9.24	7.75
R4	29455	23.18	19.44
R5	11751	9.25	7.76



CD 8

File: A-IV-1 2.10.03.002

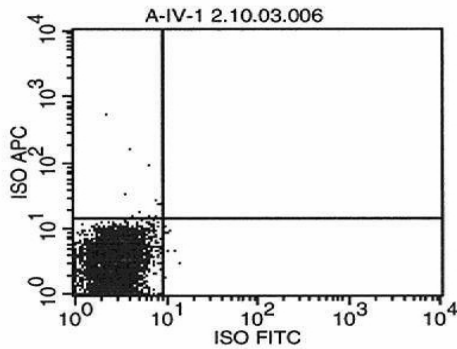
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22	0.19	0.01
UR	3	0.03	0.00
LL	11705	99.61	7.73
LR	21	0.18	0.01



CD 4

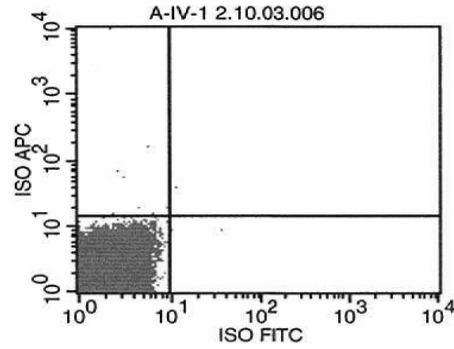
File: A-IV-1 2.10.03.002

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	21	0.07	0.01
UR	1	0.00	0.00
LL	29430	99.92	19.42
LR	3	0.01	0.00



File: A-IV-1 2.10.03.006

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	13	0.11	0.01
UR	0	0.00	0.00
LL	11775	99.80	7.81
LR	11	0.09	0.01



File: A-IV-1 2.10.03.006

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	10	0.03	0.01
UR	1	0.00	0.00
LL	29090	99.96	19.29
LR	2	0.01	0.00

### Abbildung 6: FACS-Darstellung der unstimulierten CD4 und CD8 T-Zellen

Unstimulierte CD8 und CD4 Milz-T-Lymphozyten, markiert mit CD8 PerCP Cy 5.5, CD4 PE, TNF $\alpha$ -APC, IFN $\gamma$ -FITC, Isotyp-APC und Isotyp-FITC (s. Abb. 5).

Der Unterschied der nachgewiesenen Zytokinproduktion zwischen den PMA/Ionomycin-stimulierten und den unstimulierten Zellen ist eindeutig erkennbar.

Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde in allen fünf Behandlungsgruppen mindestens 9-mal durchgeführt (Shamgruppe – 9, NaCl-Gruppe – 15, Alkohol-Gruppe – 14, NaCl-LPS-Gruppe – 12, Alkohol-LPS-Gruppe – 10).

### **3.3 Statistische Auswertung**

Nach der Analyse aller erfassten Daten, die sich aufgrund kleiner Fallzahlen und dem Vorliegen von Ausreißern auf die Ermittlung nichtparametrischer Maßzahlen (Mittelwert; Median; 25%, 50%, 75% Perzentile; Minimum; Maximum; Standardabweichung) bezieht, erfolgte die statistische Prüfung in Bezug auf signifikante Unterschiede in den Vergleichsgruppen als Folge der unterschiedlichen Behandlungen. Der Wertunterschied zwischen den verglichenen Gruppen wurde als nicht signifikant bei  $p > 0,1$ ; tendenziell bei  $0,1 > p > 0,05$ ; signifikant bei  $p < 0,05$  und hochsignifikant bei  $p < 0,01$  bezeichnet.

Zur Varianzanalyse wurde der Kruskal-Wallis-Test und bei signifikanten Ergebnissen für den Zweistichprobenvergleich - der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Übersichtsdarstellung der Daten erfolgte in Form von Tabellierung der nichtparametrischen Werte, Box-Plots und linearen Diagrammen. Verglichen wurden die folgenden Gruppen: AIV versus AV; AIV versus AIV; AV versus AVI; AV versus BIII; AVI versus BIV; BIII versus BIV.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 14.0.

## **4 Materialien**

### **4.1 Mäuse**

Weibliche Balb/c-Mäuse, 8-12 Wochen alt, Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland.

### **4.2 LPS**

Lipopolysaccharides from Escherichia coli 026:B6 von Sigma-Aldrich, Taufkirchen (purified by chromatography).

### 4.3 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav Tuttnauer 5075 ELV	Systec Labor-Systemtechnik	Wettenberg
Biofuge Fresco WCP-1	Hereaus Instruments	Hanau
Brutschrank Funktion Line Typ BB 16 CU	Hereaus Instruments	Hanau
ColdHot Pack 3M Nexcare	3M Health Care	Neuss
FACSCalibur "Waldorf und Statler"	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg
HOOD Hera Safe 18	Hereaus Instruments	Hanau
Käfig 1284L	Techniplast	Buguggiate Italien
Laminarair HBB 2448	Hereaus Instruments	Hanau
Magnetrührer Ikamag RCT	Janke & Kunkel Ika-Labortechnik	Staufen
Megafuge 1.OR WCP-1 Ausschwingsrotor&Zentrifuge	Hereaus Instruments	Hanau
Megafuge 1.OR WCP-1 Universal Zentrifuge	Hereaus Instruments	Hanau
Mikroskop ID 03	Carl Zeiss	Oberkochen
Narkosegerät Sulla 800 V, Vapor 19.3	Drägerwerk	Lübeck
Neubauer-Zählkammer Tiefe Depth	Blaubrand	Wertheim
OP- Besteck	Medka	Berlin
OP-Lampe Serien 9410728	Hereaus Instruments	Hanau
Pipetten "Pipetman" 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson	Villiers Le Bel Frankreich
Pipetboy acu	Integra Biosciences	Fernwald
Rechner PowerMacintosh G3 Serie mit CellQuest 3.3	Macintosh	Singapur
Schüttelgerät Vortex VF2	Janke & Kunkel Ika-Labortechnik	Staufen
Waage BL 310	Sartorius	Göttingen
Wells-Platte Tissue culture plate, 96W, Flat bottom	"Cellstar" Greiner Bio-One	Frickenhausen

**Tabelle 2: Verwendete Geräte und Instrumente**



## 4.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Decktuch steril	Charite Wedding TE-Einrichtung	Berlin
Einmal-Injektions-Kanüle 0,45x12mm BL/LB	"Sterican" B/Braun Melsungen	Melsungen
Einmalspritze Injekt Luer 5ml	B/Braun Melsungen	Melsungen
Einmalspritze Injekt Luer 20ml	B/Braun Melsungen	Melsungen
Einmalspritze Omnifix-F1ml 0,01ml/1,0ml	B/Braun Melsungen	Melsungen
Krankenhaus-Fertig-Rasierer	Wilkinson Sword	Solingen
Latex-OP-Handschuhe Gammex-PF steril	Ansell Malaysia	Melaka Malaysien
Nahmaterial Vicryl 5-0 V925H 70cm	Johnson & Johnson	St. Steven Belgien
Pflaster Transpore 3M	3M Medica	Neuss
Pipettenspitzen steril für Pipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt	Nümbrecht
Röhre 8ml Polystyrene Round-Bottom Tube 13x100 mm	Falcon, BD Labware	Franklin Lakes NJ, USA
Röhre 50ml 114x28mm PP	Sarstedt	Nümbrecht
Round-Bottom Tube Polystyrene 5ml 12x75 styl	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes NJ, USA
Serological Pipet 5ml, 10ml	Falcon, BD Labware	Franklin Lakes NJ, USA
Zellsiebe steril „Cell Strainer Nylon“ 70µm	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes NJ, USA

**Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

## 4.5 Antikörper

Quelle – Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konz.
Ratte anti-Maus CD4-PE (L3T4)	RM4-5	R. (DA) IgG2a,k	0,2mg/ml
Ratte anti-Maus CD8a-PerCP-Cy5.5 (Ly-2)	53-6.7	R. (LOU/Ws1/M) IgG2a,k	0,2mg/ml
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Fcγ III/II Receptor) (Fc-Block)	2.4G2	R. (Sprague-Dawley) IgG2b,k	0,5mg/ml
Ratte anti-Maus IFN $\gamma$ -FITC	XMG1.2	R. IgG1	0,5mg/ml
Ratte anti-Maus TNF $\alpha$ -APC	MP6-XT22	R. IgG1	0,2mg/ml
Ratte IgG1-APC Isotyp Kontrolle Immunoglobulin	R3-34	R. IgG1	0,2mg/ml
Ratte IgG1-FITC Isotyp Kontrolle Immunoglobulin	R3-34	R. IgG1	0,5mg/ml

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

## 4.6 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Albumin from Bovinum Serum	Sigma-Aldrich	Steinheim
Alkohol-Konzentrat 95% Braun	B/Braun Melsungen	Melsungen
Ammonium Chloride, ACS Reagent NH <sub>4</sub> CL	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Antiseptica KombiSpritz&Wisch	Antiseptica	Pulheim/ Brauweiler
Band-Aid Sprühpflaster	Johnson & Johnson Ethicon	Norderstedt
Brefeldin A, from Penicillium brefeldianum (BrfA) 99% (TLC)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Destilliertes Wasser	DRFZ	Berlin
Dormicum 5mg/1ml (Midazolamhydrochlorid)	Hoffmann-La Roche	Grenzach Wyhlen
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Carl Roth	Karlsruhe

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Ethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Fötales Bovines Serum	Biochrom	Berlin
Glucose 5 Braun (5% Infusionslösung)	B/Braun Melsungen	Melsungen
Ionomycin Calcium Salt Streptomyces Conglobatus	Sigma-Aldrich	Steinheim
Isofluran-Forene	Abbott	Wiesbaden
Kalium Hydrogencarbonat KHCO <sub>3</sub>	Merck	Darmstadt
Ketamin 50mg (Ketaminhydrochlorid) 10mg/ml	Curamed Pharma	Karlsruhe
2-Mercaptoethanol, cell culture tested liquid	Sigma-Aldrich	Steinheim
Natriumchlorid-Infusionslösung 154	Berlin-Chemie	Berlin
Panthenol-Augensalbe (Dexpanthenol)	Jenapharm	Jena
Paraformaldehyd reinst (PFA)	Merck	Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin 1000U/10000µg/ml	Biochrom	Berlin
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Saponin from Quillaja Bark	Sigma-Aldrich	Steinheim
Sodium Azide NaN <sub>3</sub>	Fluka Biochemika	Buchs Schweiz
Softasept N	B/Braun Melsungen	Melsungen
Trypan Blue Solution for microscopy 0,4%	Fluka Sigma-Aldrich	Buchs Schweiz

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien**

## 4.7 Puffer, Lösungen und Medien

### **Hepes Buffer (1M):**

sterile filtered, von Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### **Hämolysepuffer:**

10mM  $\text{KHCO}_3$  / 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  / 0,1mM EDTA / pH=7,5 / autoklavieren.

### **2-Mercaptoethanol 50 mM Lösung:**

3,4065 g 2-Mercaptoethanol / 1L Destilliertes Wasser

### **PBS:**

**Phosphate Buffered Saline** (Dulbecco) / w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , von Biochrom, Berlin

### **PBA:**

500ml PBS / 2,5g Albumin from Bovinum Serum / 0,5g  $\text{NaN}_3$

### **PFA 4%:**

4g Paraformaldehyd / 100ml PBS / bei 48°C mit Magnetrührer 4-5 Stunden lösen.

### **Saponin 5%:**

5g Saponin / 100ml PBA / mit Magnetrührer lösen.

### **Wash/Perm (0,5% Saponin):**

10ml Saponin 5% / 90ml PBS / vor Verwendung herstellen.

### **RPMI 1640 Medium:**

(w2.0g/l  $\text{NaHCO}_3$  / w0.532g/l stabile glutamine) von Biochrom, Berlin.

### **1%-FBS-Medium:**

485ml RPMI 1640 Medium / 5ml Fötale Bovines Serum / 5ml Hepes Buffer / 5ml Penicillin/Streptomycin / 500µl 2-Mercaptoethanol 50 mM.

### **10%-FBS-Medium:**

440 ml RPMI 1640 Medium / 50ml Fötale Bovines Serum / 5ml Hepes Buffer / 5ml Penicillin/Streptomycin / 500µl 2-Mercaptoethanol 50 mM.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Klinischer Zustand

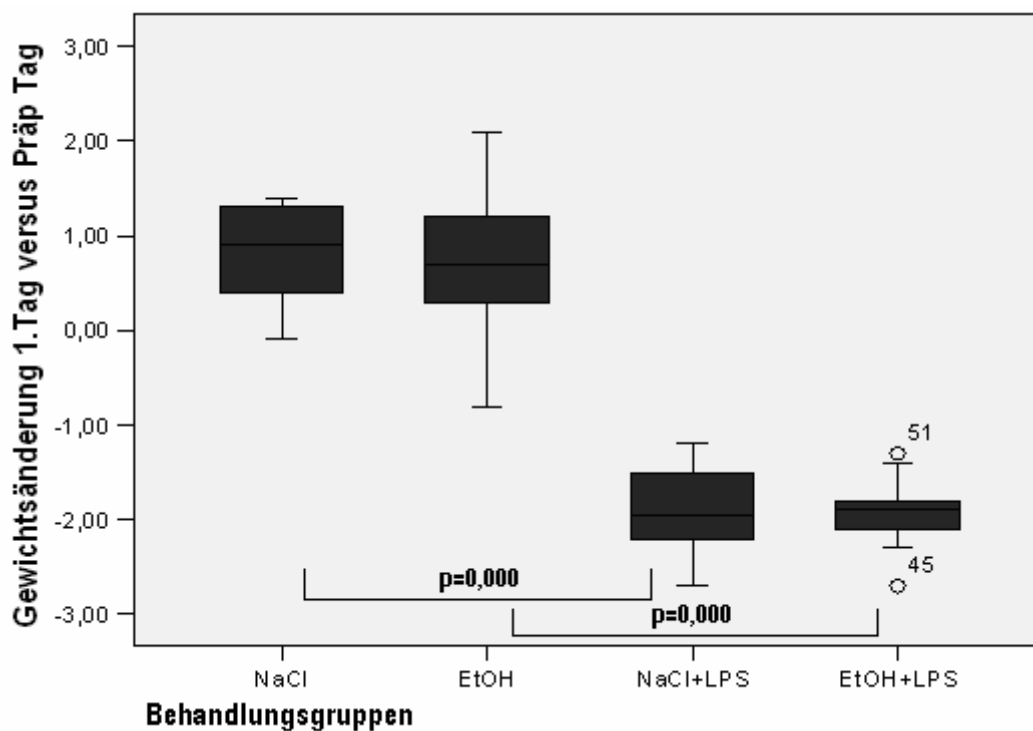
### 5.1.1 Gewichte

Zur Verfolgung der Veränderungen des Körpergewichts wurden die Mäuse im Laufe des Versuchs insgesamt 5-mal gewogen: am Tag der ersten Ethanol- bzw. NaCl-Injektion, am Tag des operativen Eingriffes, an den zwei postoperativen Tagen und am Tag der Tötung. Bei der Auswertung der Gewichtsschwankungen wurde die Gewichtszunahme bzw. Gewichtsabnahme im Vergleich zu dem Gewichtswert vom ersten Wiegen berechnet. Eine Ausnahme ist die AIV-Shamgruppe, die Mäuse die keine Injektionen bekamen, bei denen der erste Gewichtswert nicht am Tag des Injektionsanfangs, sondern gleich am OP-Tag erhoben wurde, wodurch eine Berechnung der Veränderungen des Gewichts verglichen mit dem ersten Tag nicht möglich war. Daher konnten die Gewichtswerte der AIV-Gruppe statistisch nicht ausgewertet werden.

Das Durchführen der statistischen Tests ergab die folgenden Ergebnisse:

- Am Tag der Operation nach acht Tagen der NaCl- bzw. Ethanolapplikation zeigten die mit Alkohol behandelten Mäuse eine tendenziell geringere Gewichtszunahme als die mit NaCl behandelten Tiere, der Unterschied erreichte allerdings keine Signifikanz ( $p=0,070$ ).
- Am ersten postoperativen Tag verloren die Tiere aller Versuchsgruppen an Gewicht, jedoch ohne statistische Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,319$ ).
- Am zweiten postoperativen Tag wurde in allen Gruppen eine Gewichtszunahme beobachtet, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ( $0,082$ ).

- Am Präparationstag zeigten die mit LPS und NaCl bzw. Ethanol behandelten Versuchsgruppen eine hochsignifikante Gewichtsabnahme ( $p=0,000$ ) im Vergleich zu den nur mit NaCl bzw. Ethanol behandelten Gruppen, bei denen eine weitere Gewichtszunahme verzeichnet wurde. Zwischen den mit NaCl und Ethanol behandelten Gruppen sowie zwischen den mit NaCl+LPS und Ethanol+LPS behandelten Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Veränderung des Körpergewichts festgestellt ( $p=0,747$  bzw.  $p=0,923$ ).



**Abbildung 7: Dotplot-Darstellung der statistisch analysierten Werte der Änderungen des Gewichts der Mäuse am Präparationstag versus 1. Injektionstag**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die Änderung des Gewichts der Tiere (in Gramm) am Präparationstag verglichen mit dem ersten Injektionstag angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=51.

### 5.1.2 Klinische Scores

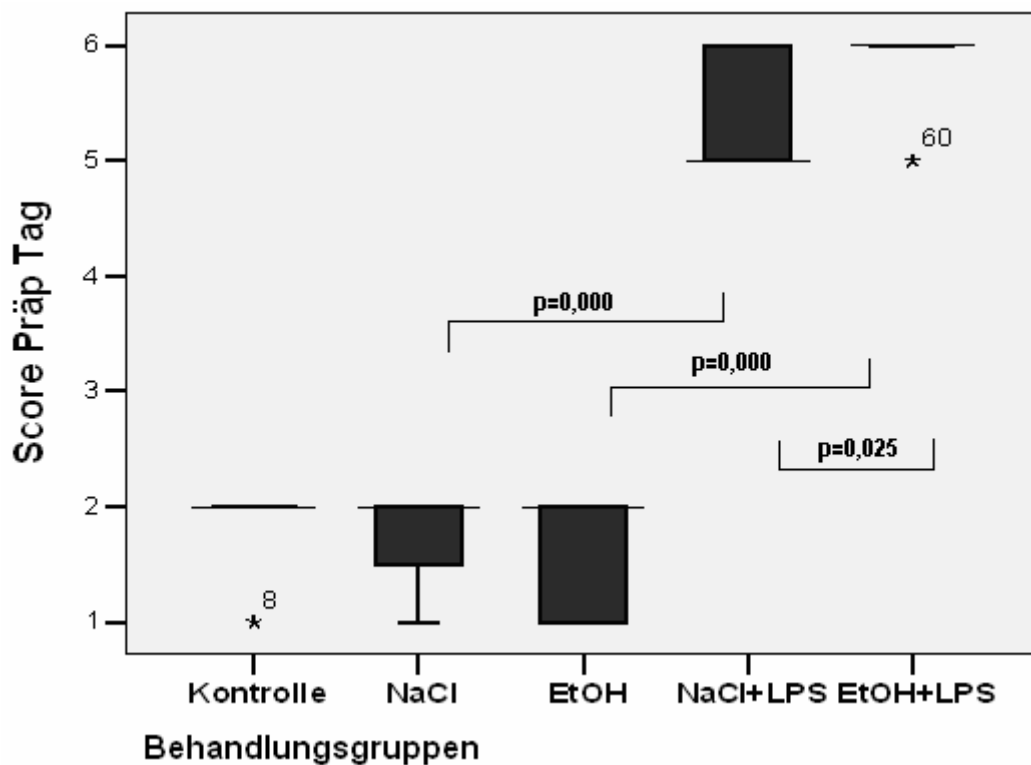
Der Zustand der Mäuse wurde mittels eines Drei-Punkte-Scores an vier Tagen bewertet: am Tag der Operation unmittelbar vor dem Eingriff, an den zwei postoperativen Tagen und am Tag der Tötung. Dazu wurden folgende klinische Zeichen erhoben:

- Motorische Aktivität (0, 1, 2)
- Entzündung der Schleimhäute mit Sekretion aus Augen, Nase, Vagina und After (0, 1, 2)
- Piloerektion (0, 1, 2).

Bei der Auswertung wurden für jedes Tier die Score-Werte von vier Tagen zusammengerechnet und statistisch analysiert. Dabei wurden die folgenden Resultate erhalten.

- An dem ersten Tag der Erhebung von klinischen Zeichen war der Zustand der Tiere von allen fünf Behandlungsgruppen unauffällig.
- Am ersten postoperativen Tag zeigten die Tiere leicht bis mittel eingeschränkte Motorik und mittlere Piloerektion ohne signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ( $p=0,621$ ). Die Schleimhäute waren unauffällig.
- Am zweiten postoperativen Tag wurden bei den Mäusen hauptsächlich eine leichte Einschränkung der motorischen Aktivität sowie eine leichte Piloerektion mit unveränderten Schleimhäuten beobachtet. Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied registriert ( $p=0,487$ ).
- Am Präparationstag variierte der klinische Zustand der Tiere als Folge der unterschiedlichen Behandlung. Während die Tiere der Sham-, NaCl- und Alkoholgruppen einen befriedigenden Zustand mit einer normalen bis leicht eingeschränkten Motorik, einer leichten Piloerektion und unauffälligen Schleimhäuten zeigten, wurden bei den mit LPS behandelten Tieren eine stark eingeschränkte motorische Aktivität, struppiges Fell und Schwellung der Schleimhäute mit Sekretion aus Augen, Nase, Vagina und After beobachtet, wobei der Zustand der mit Alkohol-LPS-Kombination behandelten Mäuse schlechter als der der mit NaCl-LPS behandelten Mäuse war.

- Zwischen den Score-Werten der Shamgruppe und den NaCl- und Ethanol-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,861$  bzw.  $p=0,439$ ).
- Verglichen miteinander ergaben die Werte der NaCl- und Ethanol-Gruppen ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0,477$ ).
- Die Score-Werte der NaCl-LPS-Gruppe waren hochsignifikant höher als die der NaCl-Gruppe ( $p=0,000$ )
- Ebenso waren die Score-Werte der Ethanol-LPS-Gruppe im Vergleich zu den Werten der Ethanol-Gruppe hochsignifikant höher ( $p=0,000$ ).
- Die Score-Werte der Ethanol-LPS-Gruppe waren signifikant höher als die von der NaCl-LPS-Gruppe ( $p=0,025$ ).



**Abbildung 8: Dotplot-Darstellung der statistisch analysierten klinischen Scores am Präparationstag**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die für jede einzelne Maus berechnete Summe von den drei Werten des klinischen Scores am Präparationstag angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

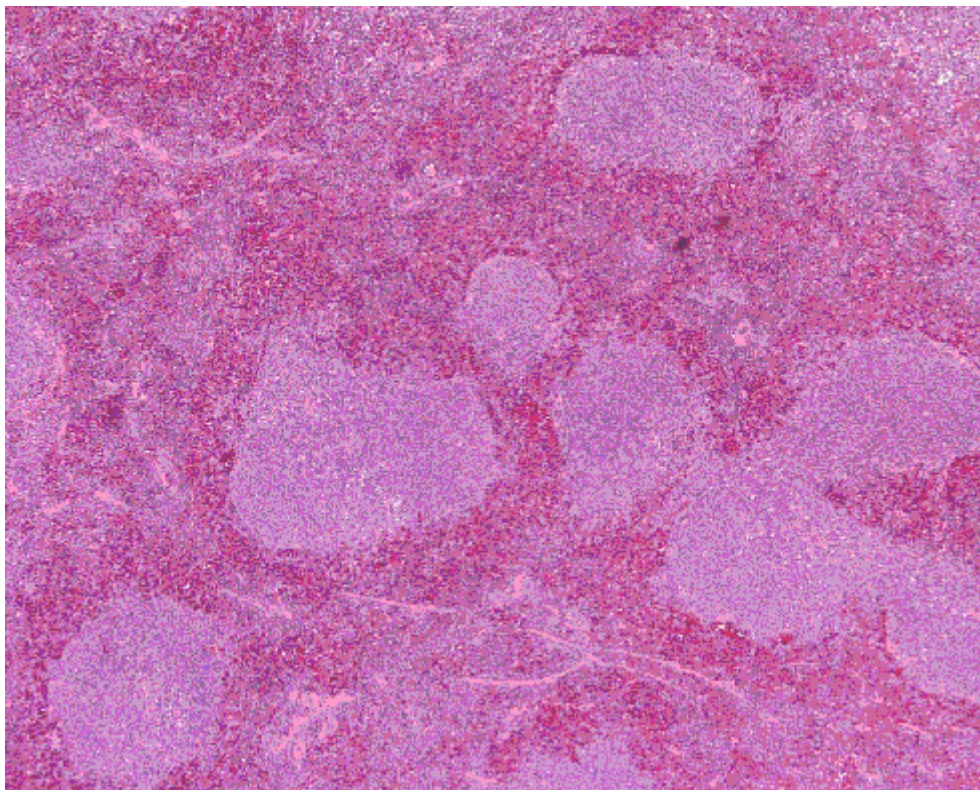


## 5.2 Pathologische Krankheitszeichen

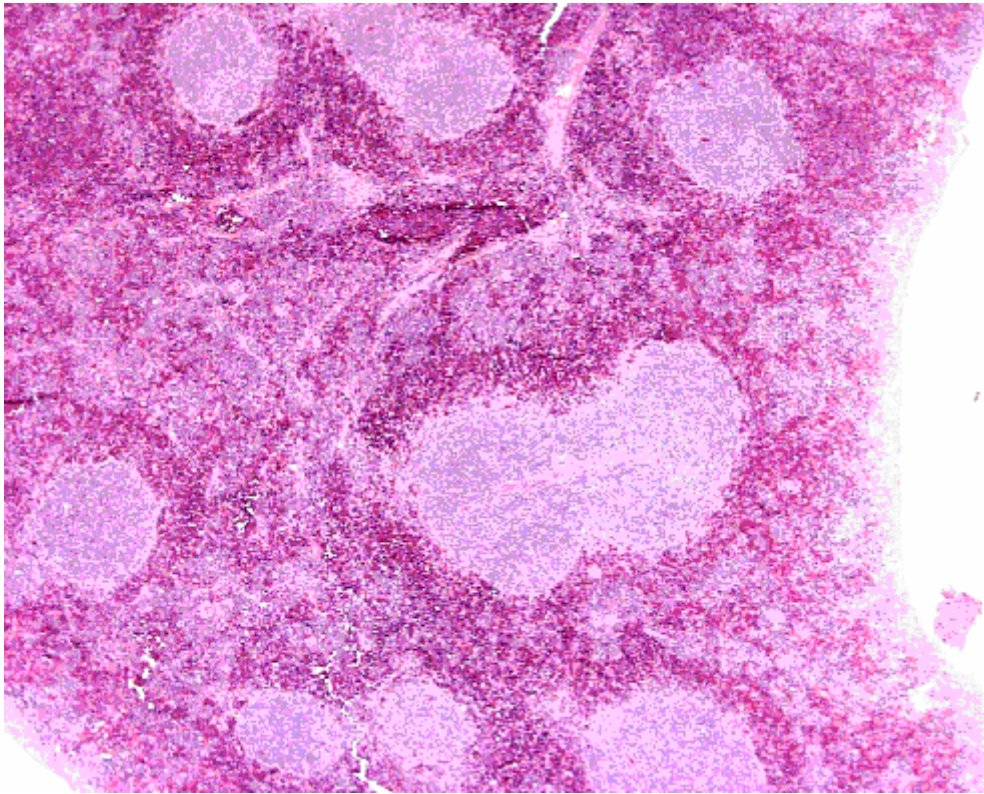
Zur Beurteilung der Folgen von der LPS-induzierten Endotoxinämie wurden histologische Schnitte von Milzen der Tiere von allen fünf Behandlungsgruppen angefertigt und mikroskopisch untersucht.

In den Milzpräparaten von Tieren der Sham-, NaCl- und Ethanol-Gruppen zeigte sich eine normale histologische Struktur der roten und weißen Pulpen ohne erkennbare Infiltrationsmerkmale. Bei den Milzen von den Mäusen der beiden mit LPS-behandelten Gruppen konnten hingegen die histologischen Anzeichen einer Entzündung nachgewiesen werden. Die lymphofollikuläre Aktivierung des Milzgewebes ist durch die Erhöhung der Anzahl von Lymphozyten, deren Vergrößerung und partielle Verschmelzung erkennbar.

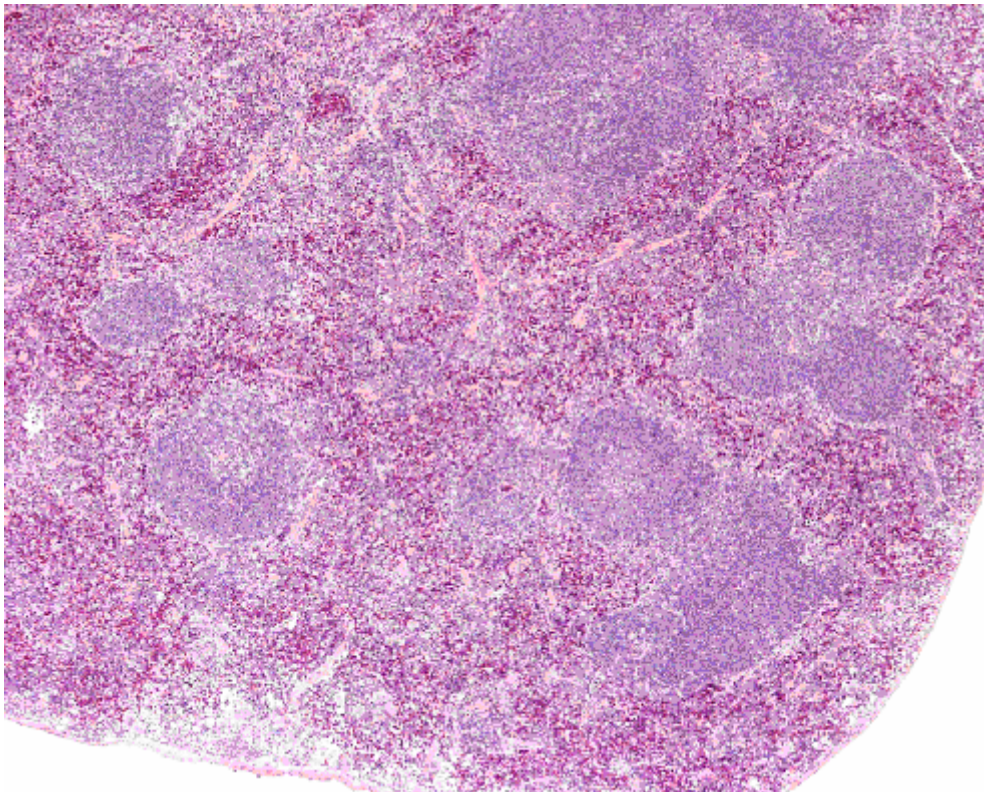
Um die Wirkung von Alkohol auf Lebergewebe zu kontrollieren, wurden histologische Schnitte der Leber von den Mäusen der Shamgruppe und mit Alkohol behandelten Mäusen hergestellt. Bei allen Präparaten wurde eine regelrechte Leberstruktur mit erkennbaren A. interlobulares, V. interlobulares und D. interlobulares gesehen, ein histologischer Unterschied zwischen den untersuchten Lebern von den Tieren der Sham-Gruppe und der Ethanol-Gruppe konnte dabei nicht nachgewiesen werden.



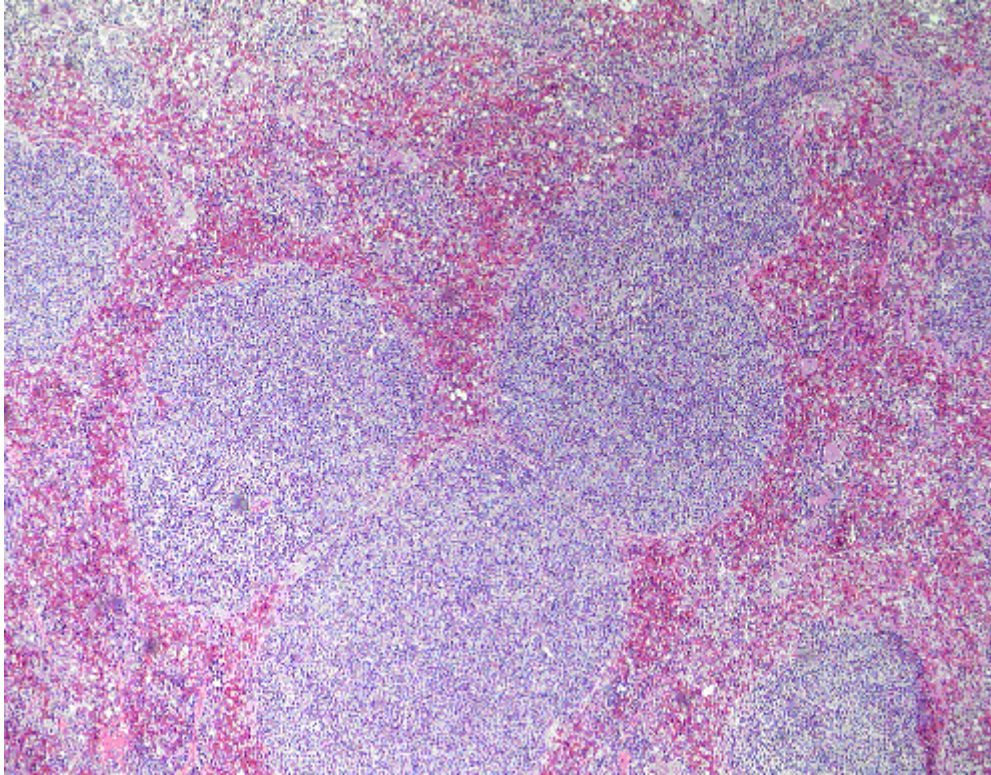
**Abbildung 9: Milzpräparat von einer Maus der Sham-Gruppe**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 50.



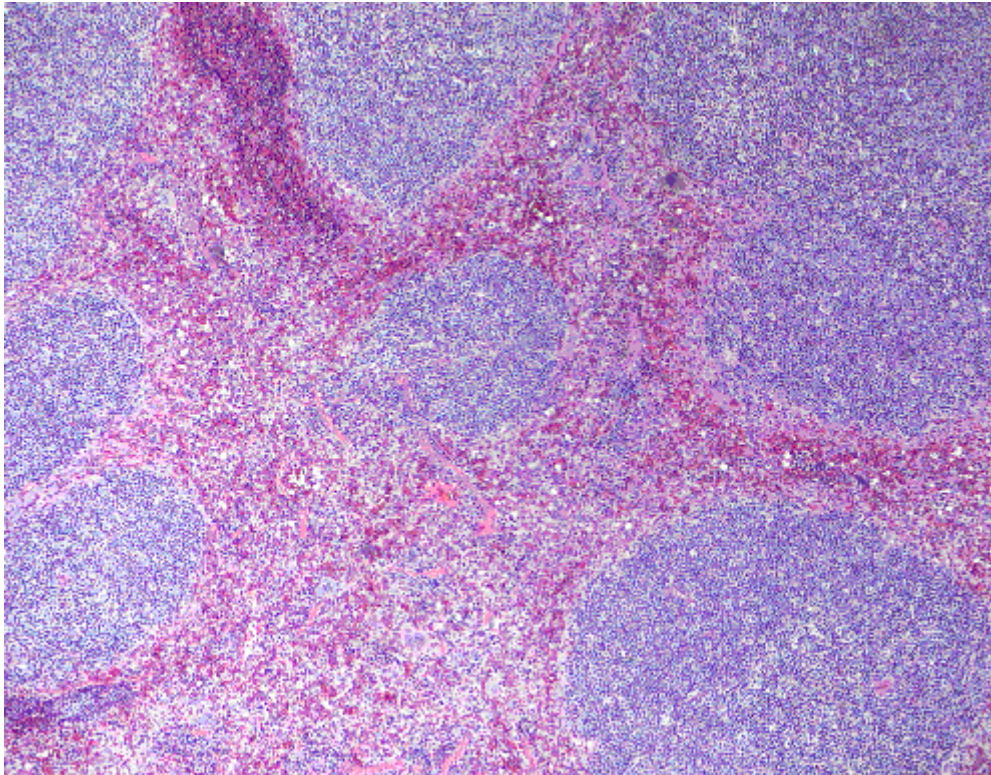
**Abbildung 10: Milzpräparat von einer Maus der NaCl –Gruppe**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 50.



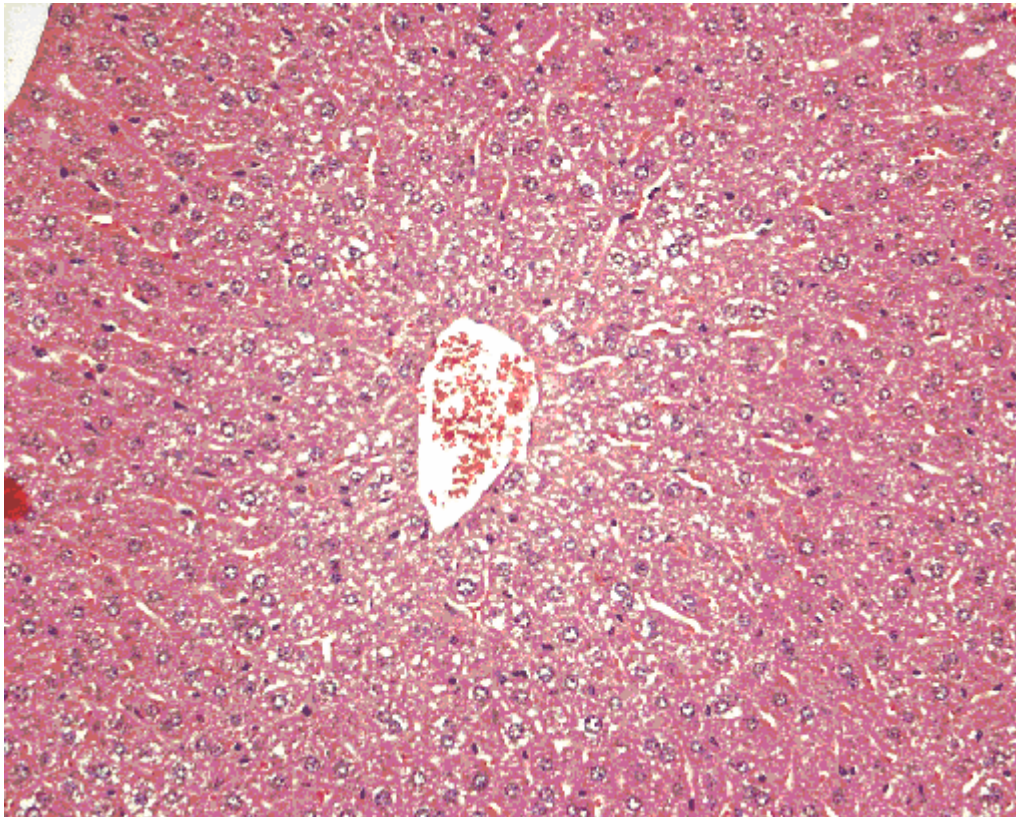
**Abbildung 11: Milzpräparat von einer Maus der Ethanol-Gruppe**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 50.



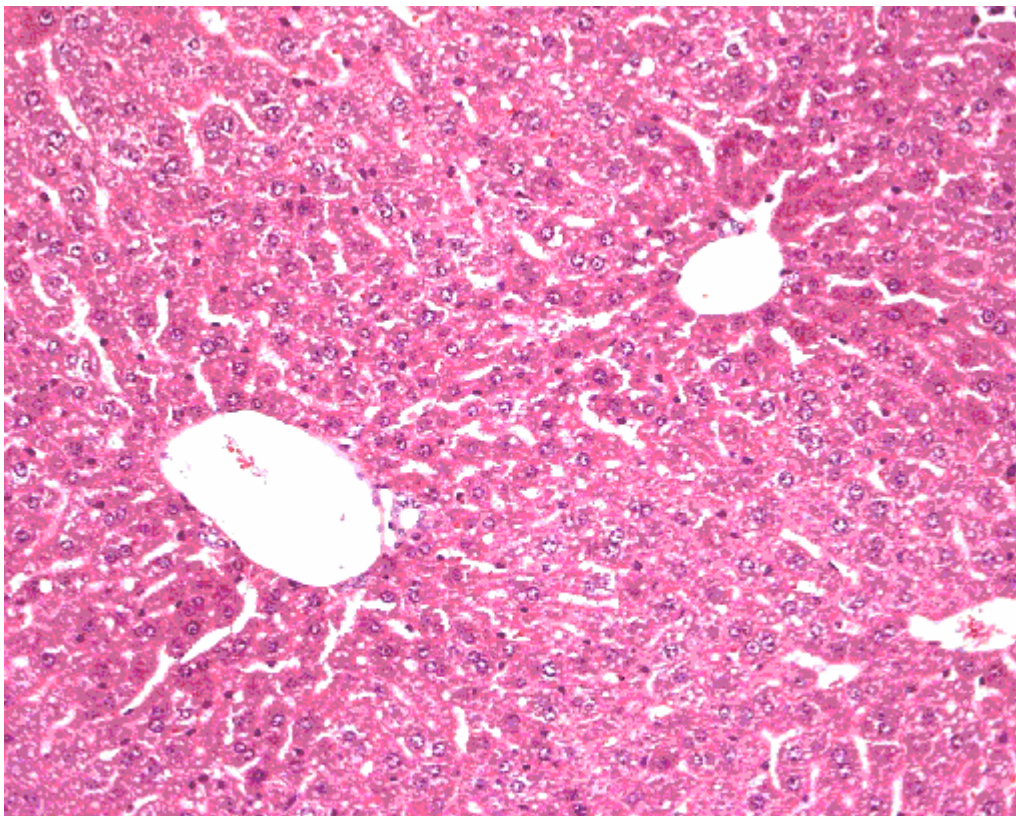
**Abbildung 12: Milzpräparat von einer Maus der NaCl-LPS-Gruppe.**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 50.



**Abbildung 13: Milzpräparat von einer Maus der Ethanol-LPS-Gruppe.**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 50.



**Abbildung 14: Leberpräparat von einer Maus der Sham-Gruppe**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 200.



**Abbildung 15: Leberpräparat von einer Maus der Ethanol-Gruppe**  
HE-Färbung. Originalvergrößerung x 200

## 5.3 Blutalkoholbestimmung

Die Bestimmung des Blutalkoholspiegels wurde ca. eine Stunde nach der letzten Alkoholapplikation bei vier Tieren durchgeführt.

Nach der statistischen Auswertung der Messwerte ergaben sich die folgenden Ergebnisse:

- ein Promille-Mittelwert von 2,97 mg/g mit einer Standardabweichung von 0,71 mg/g
- eine Mittelwert der Blutalkoholkonzentration 3,14 mg/ml mit einer Standardabweichung von 0,76 mg/ml.

## 5.4 Durchflusszytometrie

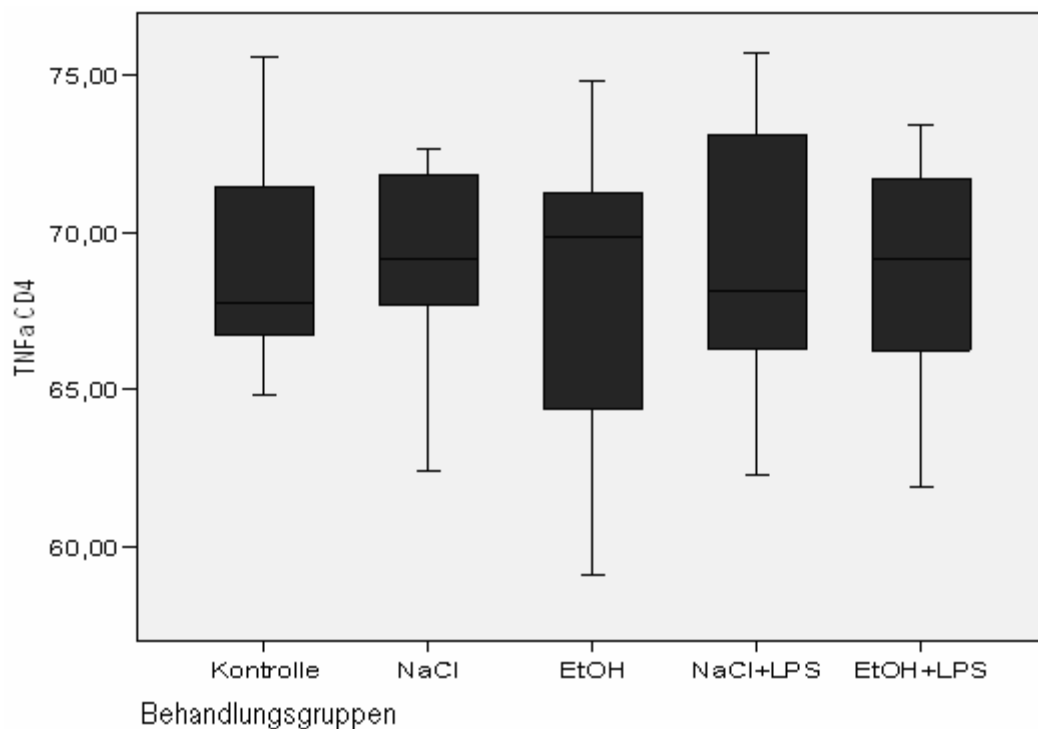
Die TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 T-Lymphozyten wurden in allen fünf Behandlungsgruppen gemessen. Die Messungen der stimulierten Zellsuspensionen ergaben eine nachweisbare TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Produktion von CD4 und CD8 T-Lymphozyten, die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von unstimulierten Zellsuspensionen erwiesen keine detektierbare Zytokinproduktion (S. Abb. 5, 6).

### 5.4.1 Tumornekrosefaktor alpha

Die Anteile von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) - produzierenden CD4 und CD8 Milz-T-Lymphozyten wurden so bestimmt, dass in jeder CD-Population jeweils die „nur TNF $\alpha$ “-Zellen (UL-Quadrant der Quadrantenstatistik)) und insgesamt alle TNF $\alpha$ -exprimierenden Zellen (UL- und UR-Quadranten) ausgewertet wurden.

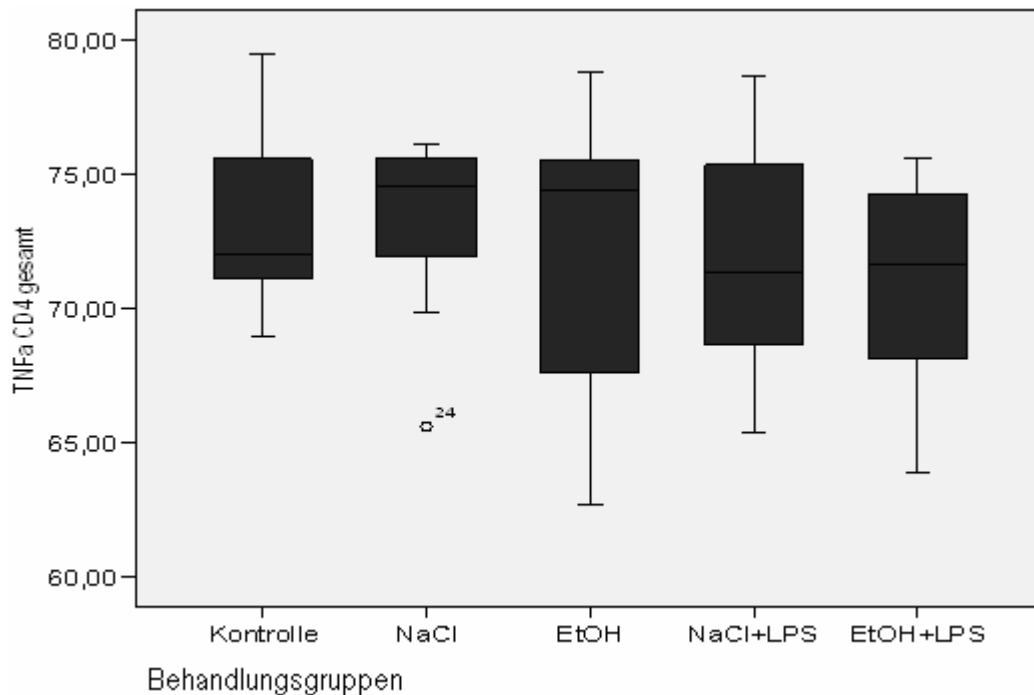
### 5.4.1.1 TNF-alpha-Produktion der CD4 T-Lymphozyten

Die durchflusszytometrisch gemessenen Werte TNF $\alpha$ -positiver CD4 T-Lymphozyten bei allen fünf Behandlungsgruppen lagen sehr dicht aneinander, folglich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Der Kruskal-Wallis-Test ergab bei der Analyse der „nur TNF $\alpha$ “-produzierenden Zellen ein  $p=0,990$  und bei der Analyse aller TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen ein  $p=0,635$ .



**Abbildung 16: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur TNF-alpha“-CD4 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der nur TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten angegeben. Zwischen den Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden mit einem  $p=0,990$  (Kruskal-Wallis-Test).  $N=60$ .



**Abbildung 17: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller TNF-alpha-positiven CD4 T-Zellen**

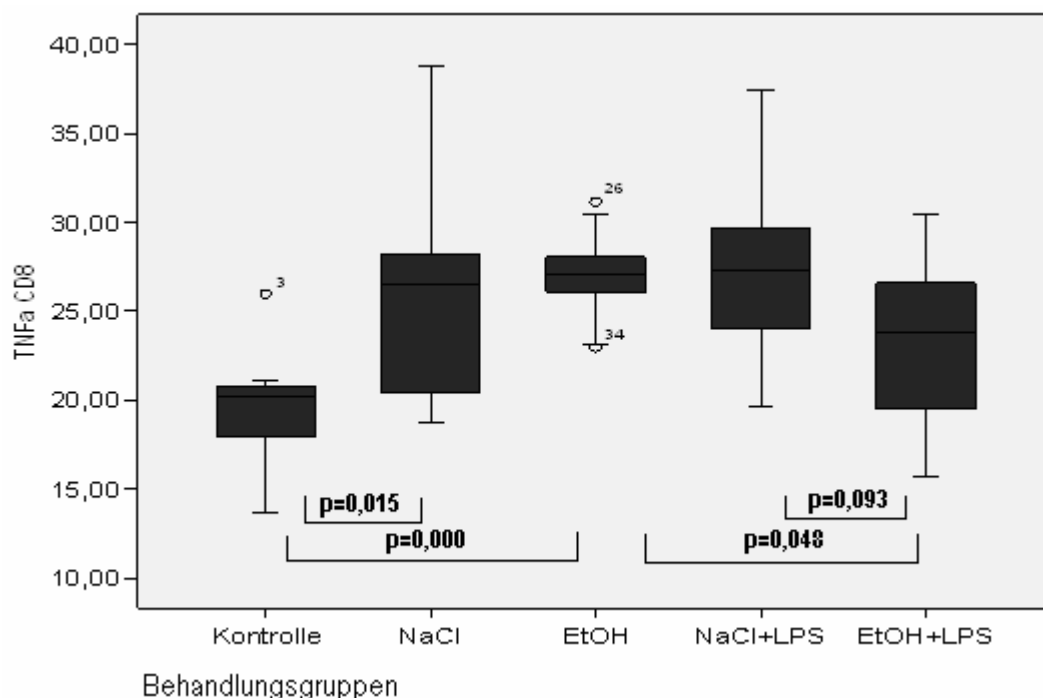
Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile aller TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten („nur TNF $\alpha$ -CD4-Zellen plus „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4-Zellen) angegeben. Zwischen den Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden mit einem  $p=0,635$  (Kruskal-Wallis-Test).  $N=60$ .

#### 5.4.1.2 TNF-alpha-Produktion der CD8 T-Lymphozyten

Die statistische Analyse **nur TNF $\alpha$ -produzierender CD8 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Versuchsgruppen ergab die folgenden Ergebnisse:

- Der Anteil von ausschließlich TNF $\alpha$ -positiven CD4 Zellen von den Tieren der Shamgruppe war signifikant niedriger als der Anteil der Zellen von den Tieren der mit NaCl behandelten Gruppe ( $p=0,015$ ).
- Im Vergleich zum Anteil nur TNF $\alpha$ -produzierender CD4 Zellen von den Mäusen der mit Ethanol behandelten Gruppe war der Anteil der Zellen von den Mäusen der Shamgruppe hochsignifikant niedriger ( $p=0,000$ ).
- Der Vergleich der Anteilswerte ausschließlich TNF $\alpha$ -positiver CD4 Zellen von den mit NaCl und mit Ethanol behandelten Tieren untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,270$ ).

- Der Anteil nur TNF $\alpha$ -produzierender CD4 Zellen von den Mäusen der NaCl-Gruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Mäusen der NaCl-LPS-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,373$ ).
- Der Anteil ausschließlich TNF $\alpha$ -positiver CD4 Zellen von den mit Ethanol behandelten Tieren war signifikant erhöht im Vergleich zum Anteil der Zellen von den mit Ethanol und LPS behandelten Tieren ( $p=0,048$ )
- Der Anteil nur TNF $\alpha$ -produzierender CD4 Zellen von den Mäusen der NaCl-LPS-Gruppe war höher als der Anteil der Zellen von den Mäusen der Ethanol-LPS-Gruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen erreichte zwar keine statistische Signifikanz ( $p=0,093$ ), kann aber als tendenziell bezeichnet werden.



**Abbildung 18: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur TNF-alpha“- CD8 T-Zellen**

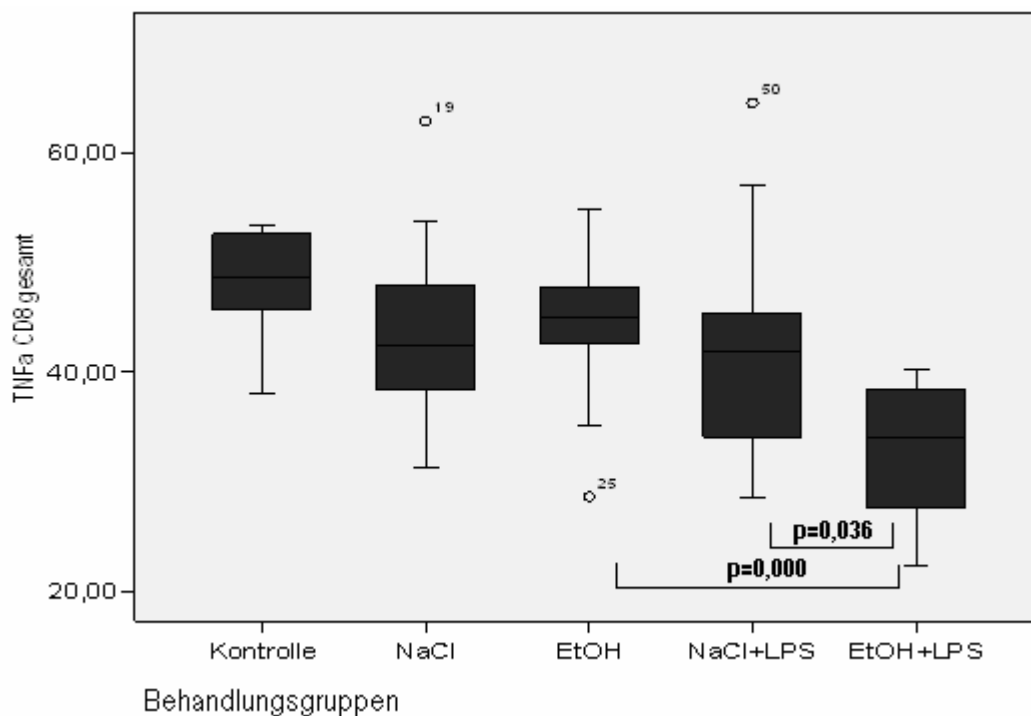
Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der nur TNF $\alpha$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

Die Durchführung der statistischen Tests für **gesamte TNF $\alpha$ -produzierende CD8 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Behandlungsgruppen ergab die folgenden Resultate.

- Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -positiver CD8 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe war höher als der Anteil der Zellen von den Mäusen der NaCl-Gruppe, dieser Unterschied erreichte jedoch kein signifikantes Niveau ( $p=0,155$ ).



- Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -produzierender CD8 Zellen von den Tieren der Shamgruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,224$ ).
- Die Anteilswerte gesamter TNF $\alpha$ -positiver CD8 Zellen von den mit NaCl und mit Ethanol behandelten Mäusen lagen relativ in einem Bereich ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,354$ ).
- Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -exprimierender CD8 Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der NaCl-LPS-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,719$ ).
- Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -positiver CD8 Zellen von den mit Ethanol behandelten Mäusen war hochsignifikant erhöht im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Mäusen, denen die Kombination Ethanol und LPS appliziert wurde ( $p=0,000$ ).
- Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -produzierender CD8 Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe erwies eine signifikante Erhöhung verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der NaCl-LPS-Gruppe ( $p=0,036$ ).



**Abbildung 19: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller TNF-alpha-positiven CD8 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile aller TNF $\alpha$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten („nur TNF $\alpha$ -CD8-Zellen plus „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ -CD8-Zellen) angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

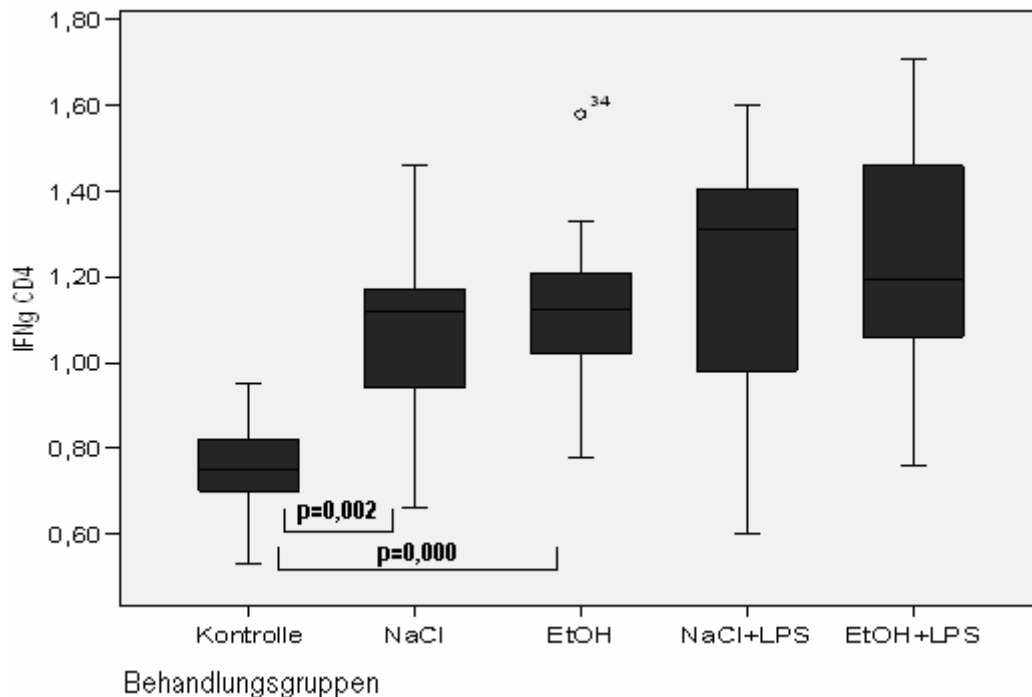
## 5.4.2 Interferon gamma

Die Anteile von Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) - produzierenden CD4 und CD8 Milz-T-Lymphozyten wurden bei CD4- bzw. CD8 Population jeweils für die „nur IFN $\gamma$ “-Zellen (LR-Quadrant der Quadrantenstatistik) und insgesamt alle IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen (LR- und UR-Quadranten) berechnet und statistisch ausgewertet.

### 5.4.2.1 IFN-gamma-Produktion der CD4 T-Lymphozyten

Bei der statistischen Analyse **nur IFN $\gamma$ -exprimierender CD4 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Behandlungsgruppen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

- ein hochsignifikant niedrigerer Anteil nur IFN $\gamma$ -positiver CD4 Zellen von den Tieren der Shamgruppe im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Tieren der mit NaCl behandelten Gruppe ( $p=0,002$ );
- ein ebenfalls hochsignifikant niedrigerer Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -produzierender CD4 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe verglichen mit dem Anteil der Zellen von den mit Ethanol behandelten Mäusen ( $p=0,000$ );
- aneinander relativ dicht liegende Anteilswerte nur IFN $\gamma$ -exprimierender CD4 Zellen von den Tieren der NaCl- und Ethanol-Gruppen ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,652$ );
- ein niedrigerer Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -positiver CD4 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen im Vergleich zu dem Anteil der Zellen von den mit der Kombination NaCl-LPS behandelten Mäusen, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,152$ );
- kein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil nur IFN $\gamma$ -produzierender CD4 Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe und dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,341$ );
- kein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilswerten nur IFN $\gamma$ -produzierender CD4 Zellen von den Mäusen der NaCl-LPS-Gruppe und Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,974$ ).



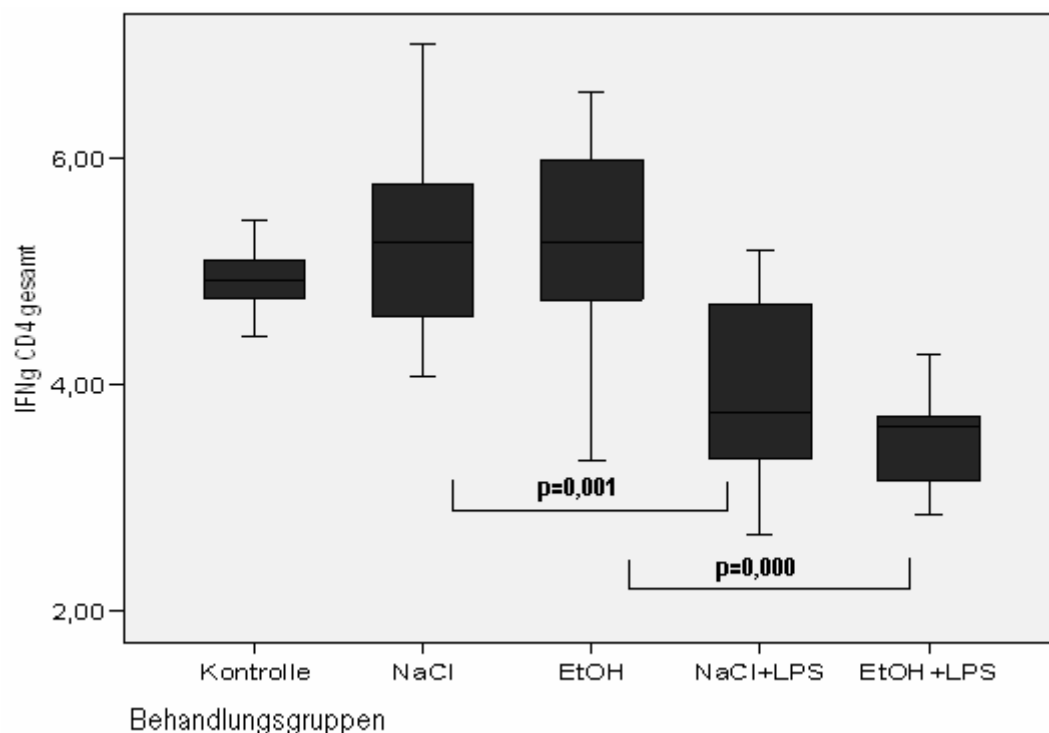
**Abbildung 20: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur-IFN-gamma“- CD4 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der nur IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

Die statistischen Tests für **gesamte IFN $\gamma$ -exprimierende CD4 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Versuchsgruppen brachten die folgenden Resultate.

- Der Anteil gesamter IFN $\gamma$ -positiver CD4 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,318$ ).
- Der Vergleich der Anteilswerte gesamter IFN $\gamma$ -exprimierender CD4 Zellen von den Tieren der Shamgruppe und der Ethanol-Gruppe untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,201$ ).
- Die relativ in einem Bereich liegenden Anteilswerte gesamter IFN $\gamma$ -produzierender CD4 Zellen von den Tieren der NaCl- und Ethanol-Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,652$ ).
- Der Anteil gesamter IFN $\gamma$ -positiver CD4 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen war signifikant höher als der von den mit NaCl und LPS behandelten Mäusen ( $p=0,001$ ).

- Der Anteil gesamtter IFN $\gamma$ -sezernierender CD4 Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe war hochsignifikant erhöht verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,000$ ).
- Beim Vergleich der Anteilswerte gesamtter IFN $\gamma$ -exprimierender CD4 Zellen von den Tieren der NaCl-LPS-Gruppe und der Ethanol-LPS-Gruppe untereinander wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ( $p=0,456$ ).



**Abbildung 21: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller IFN-gamma-positiven CD4 T-Zellen**

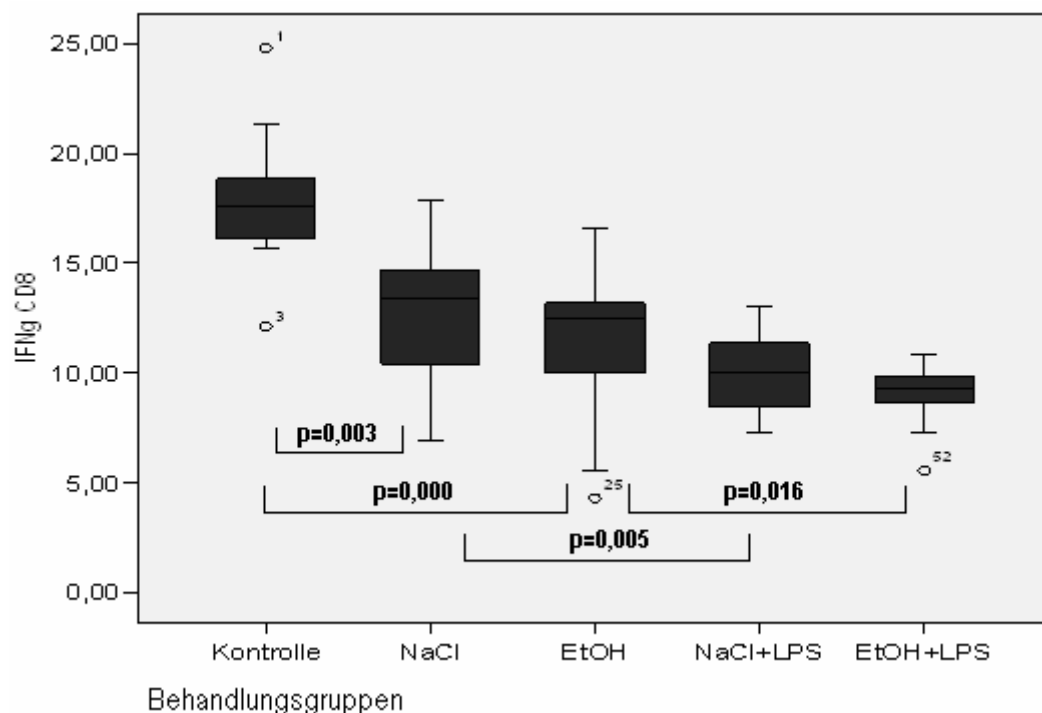
Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile aller IFN $\gamma$ -produzierender CD4 T-Lymphozyten („nur IFN $\gamma$ -CD4-Zellen plus „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ -CD4-Zellen) angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

#### 5.4.2.2 IFN-gamma-Produktion der CD8 T-Lymphozyten

Bei der statistischen Analyse **nur IFN $\gamma$ -produzierender CD8 Milz T-Lymphozyten** in allen fünf Behandlungsgruppen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

- Der Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -positiver CD8 Zellen von den Tieren der Shamgruppe war hochsignifikant höher als der der Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe ( $p=0,003$ ).

- Verglichen mit dem Anteil nur IFN $\gamma$ -exprimierender CD8 Zellen von den Mäusen der Ethanol-Gruppe war der Anteil der Zellen von den Mäusen der Shamgruppe ebenfalls hochsignifikant hoch ( $p=0,000$ ).
- Der Vergleich der Anteilswerte nur IFN $\gamma$ -produzierender CD8 Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe und der Ethanol-Gruppe untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,201$ ).
- Der Anteil ausschließlich IFN $\gamma$ -positiver CD8 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen war hochsignifikant höher als der Anteil der Zellen von den mit NaCl und LPS behandelten Mäusen ( $p=0,005$ ).
- Der Anteil nur IFN $\gamma$ -produzierender CD8 Zellen von Tieren der Ethanol-Gruppe war signifikant erhöht verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,016$ ).
- Die Anteilswerte nur IFN $\gamma$ -sezernierender CD8 Zellen von den Mäusen der NaCl-LPS-Gruppe und der Ethanol-LPS-Gruppe lagen relativ in einem Bereich ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,254$ ).

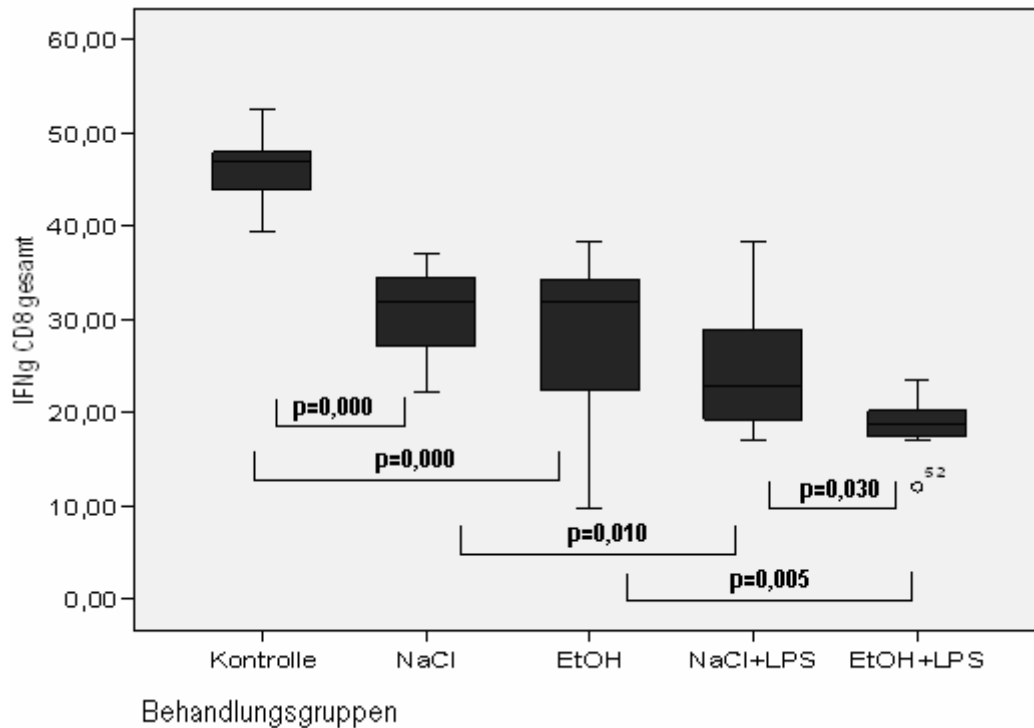


**Abbildung 22: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur-IFN-gamma“- CD8 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der nur IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

Die statistischen Tests für **gesamte IFN $\gamma$ -produzierende CD8 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Versuchsgruppen brachten die folgenden Resultate:

- einen hochsignifikant höheren Anteil gesamter IFN $\gamma$ -positiver CD8 Zellen von den Tieren der Shamgruppe verglichen mit dem Anteil von den Tieren der NaCl-Gruppe ( $p=0,000$ );
- einen genauso hochsignifikant höheren Anteil gesamter IFN $\gamma$ -exprimierender CD8 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Mäusen der Ethanol-Gruppe ( $0,000$ );
- keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Anteilswert gesamter IFN $\gamma$ -produzierender CD8 Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe und dem Anteilswert der Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe ( $p=0,914$ );
- einen signifikant erhöhten Anteil gesamter IFN $\gamma$ -positiver CD8 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen verglichen mit dem Anteil der Zellen von den mit NaCl und LPS behandelten Mäusen ( $p=0,010$ );
- einen hochsignifikant höheren Anteil gesamter IFN $\gamma$ -sezernierender CD8 Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $0,005$ );
- einen signifikant erniedrigten Anteil gesamter IFN $\gamma$ -exprimierender CD8 Zellen von den mit Ethanol und LPS behandelten Mäusen verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Mäusen, denen NaCl und LPS appliziert wurde ( $p=0,030$ ).



**Abbildung 23: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller IFN-gamma-positiven CD8 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile aller IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten („nur IFN $\gamma$ -CD8-Zellen plus „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ -CD8-Zellen) angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

### 5.4.3 Tumornekrosefaktor alpha und Interferon gamma

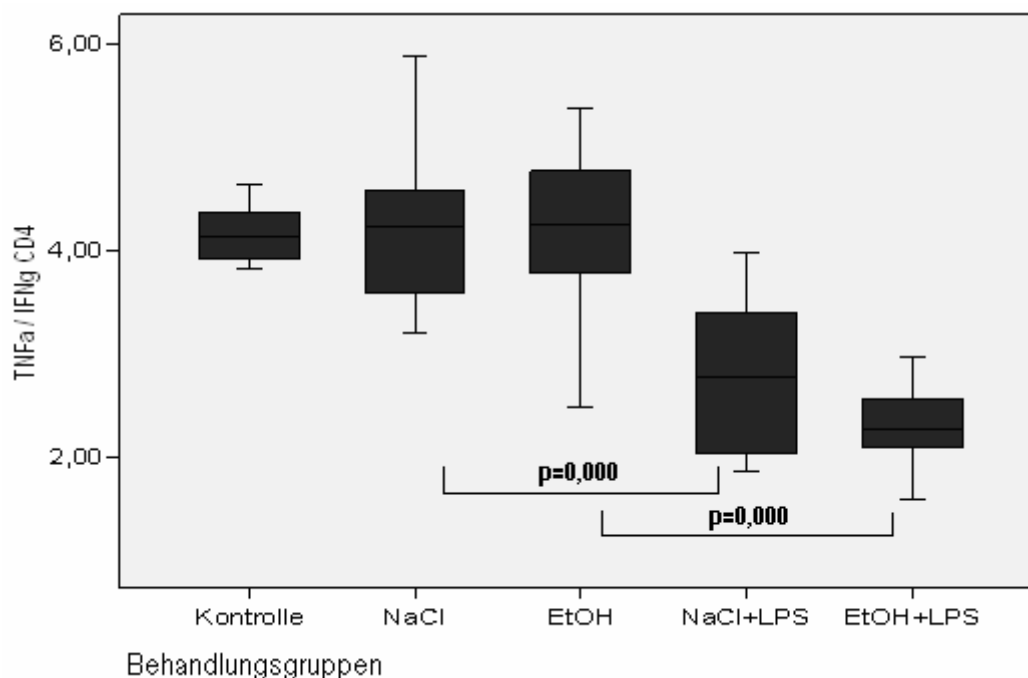
Die Anteile von denen CD4 und CD8 Milz-T-Lymphozyten, die für Produktion von sowohl Tumornekrosefaktor  $\alpha$  als auch Interferon  $\gamma$  verantwortlich sind, wurden bei der CD4- und der CD8 Population für die „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ -Zellen (UR-Quadrant der Quadrantenstatistik) berechnet und statistisch ausgewertet.

#### 5.4.3.1 TNF-alpha- und IFN-gamma-Produktion der CD4 T-Lymphozyten

Bei der statistischen Analyse **TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ -positiver CD4 Milz T-Lymphozyten** bei allen fünf Versuchsgruppen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ -CD4 Zellen von den Tieren der Shamgruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich (p=0,907).

- Der Vergleich des Anteilswerts der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe zum Anteilswert der Zellen von den Mäusen der Ethanol-Gruppe ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,829$ ).
- Die Anteilswerte der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4 Zellen von den Tieren der NaCl-Gruppe und der Ethanol-Gruppe lagen relativ in einem Bereich ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,747$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen war hochsignifikant höher als der der Zellen von den mit NaCl und LPS behandelten Mäusen ( $p=0,000$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4 Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe war hochsignifikant erhöht im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,000$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD4 Zellen von den Mäusen der NaCl-LPS-Gruppe war verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,228$ ).



**Abbildung 24: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der sowohl TNF-alpha- als auch IFN-gamma-positiven CD4 T-Zellen**

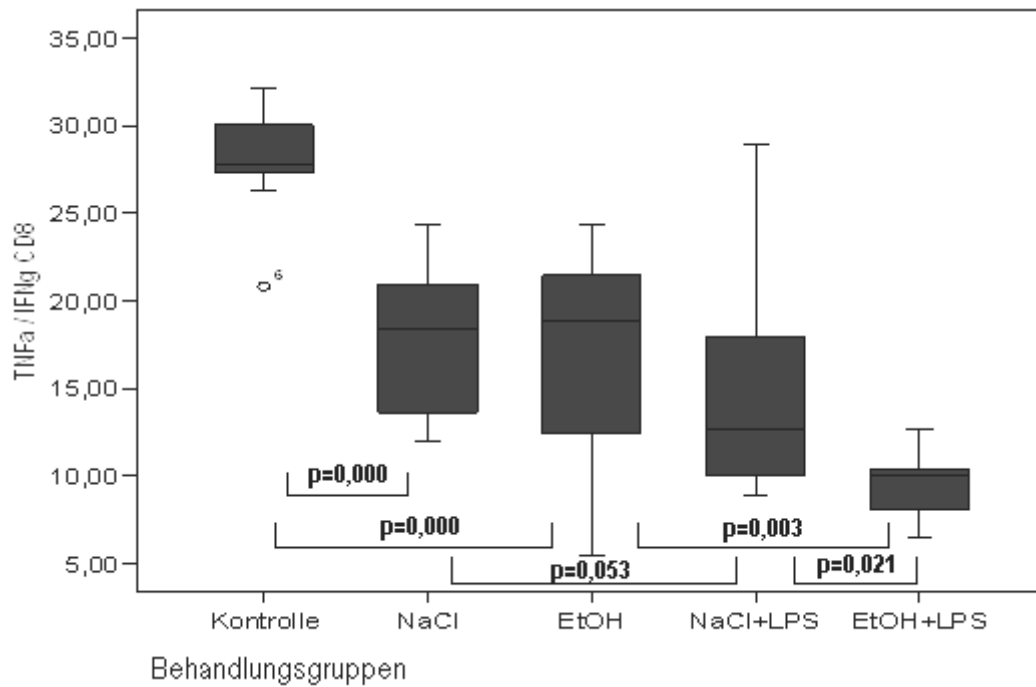
Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der CD4 T-Lymphozyten, die sowohl TNF $\alpha$  als auch IFN $\gamma$  produzieren, angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.



#### 5.4.3.2 TNF-alpha- und IFN-gamma-Produktion der CD8 T-Lymphozyten

Die statistischen Tests für **die sowohl TNF $\alpha$  als auch IFN $\gamma$  -exprimierenden CD8 Milz T-Lymphozyten** in allen fünf Versuchsgruppen brachten die folgenden Resultate.

- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den Tieren der Shamgruppe war hochsignifikant höher als der Anteil der Zellen der NaCl-Gruppe ( $p=0,000$ ).
- Ebenfalls hochsignifikant höher war der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den Mäusen der Shamgruppe als der Anteil der Zellen von den Mäusen der Ethanol-Gruppe ( $p=0,000$ ).
- Die Anteilswerte der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den Tieren der NaCl- und Ethanol-Gruppen lagen relativ dicht aneinander ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=1,000$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den mit NaCl behandelten Mäusen war erhöht im Vergleich zum Anteil der Zellen von den mit NaCl und LPS behandelten Mäusen mit einem tendenziell signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,053$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den Tieren der Ethanol-Gruppe war hochsignifikant erhöht verglichen mit dem Anteil der Zellen von den Tieren der Ethanol-LPS-Gruppe ( $p=0,003$ ).
- Der Anteil der „TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$ “-CD8 Zellen von den mit Ethanol-LPS-Kombination behandelten Mäusen waren signifikant erniedrigt im Vergleich zum Anteil der Zellen von den Mäusen, denen die NaCl-LPS-Kombination appliziert wurde ( $p=0,021$ ).



**Abbildung 25: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der sowohl TNF-alpha- als auch IFN-gamma-positiven CD8 T-Zellen**

Auf der X-Achse sind die Behandlungsgruppen und auf der Y-Achse die durchflusszytometrisch registrierten prozentualen Anteile der CD8 T-Lymphozyten, die sowohl TNF $\alpha$  als auch IFN $\gamma$  produzieren, angegeben. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und deren p-Werte (Mann-Whitney-Test) sind extra eingezeichnet. N=60.

## 5.4.4 Zusammenfassung von Ergebnissen der Durchflusszytometrie

### 5.4.4.1 CD4 T-Lymphozyten

Vergleichsgruppen	CD4 T-Lymphozyten				
	TNF $\alpha$	TNF $\alpha$ gesamt	TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	IFN $\gamma$	IFN $\gamma$ gesamt
Kontrolle - NaCl				↑	
Kontrolle - Ethanol				↑	
NaCl - Ethanol					
NaCl - NaCl-LPS			↓		↓
Ethanol - Ethanol-LPS			↓		↓
NaCl-LPS - Ethanol-LPS					

**Tabelle 6: Ergebnisse der FACS-Messungen von CD4 T-Lymphozyten**

Mit grauer Farbe sind signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezeichnet. Die Pfeile zeigen eine Erhöhung bzw. Senkung der Werte von der zweiten Vergleichsgruppe im Vergleich zu der Ersten.

Die erhaltenen Messergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

1. Ethanol bewirkte keine Veränderungen der prozentualen Anteile TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierender CD4-Zellen (bei der Kombination Ethanol+LPS erfolgt die Reaktion auf LPS, aber nicht auf Ethanol);
2. Der Anteil gesamter TNF $\alpha$ -produzierender CD4-T-Lymphozyten wurde von keinem der Behandlungsfaktoren (Stichtrauma, Alkohol, LPS) beeinflusst;
3. LPS löste eine Senkung des prozentualen Anteils gesamter IFN $\gamma$ -produzierender CD4-T-Lymphozyten aus.

#### 5.4.4.2 CD8 T-Lymphozyten

Vergleichsgruppen	CD8 T-Lymphozyten				
	nurTNF $\alpha$	TNF $\alpha$ gesamt	TNF $\alpha$ -und-IFN $\gamma$	nur IFN $\gamma$	IFN $\gamma$ gesamt
Kontrolle - NaCl	↑		↓	↓	↓
Kontrolle - Ethanol	↑		↓	↓	↓
NaCl - Ethanol					
NaCl - NaCl-LPS			↓	↓	↓
Ethanol - Ethanol-LPS	↓	↓	↓	↓	↓
NaCl-LPS - Ethanol-LPS	↓	↓	↓		↓

**Tabelle 7: Ergebnisse der FACS-Messungen bei CD8 T-Lymphozyten**

Mit hellgrauer Farbe sind signifikante und mit dunkelgrauer Farbe tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen bezeichnet. Die Pfeile zeigen eine Erhöhung bzw. Senkung der Werte von der zweiten Vergleichsgruppe im Vergleich zu der Ersten.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. die prozentualen Anteile TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierender CD8-Zellen wurden in Folge einer alleinigen Ethanol-Applikation nicht verändert;
2. die LPS-Applikation hatte keine Auswirkungen auf den Anteil TNF $\alpha$ -produzierender CD8 T-Lymphozyten, der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8-Zellen war nach einer LPS-Gabe jedoch deutlich gesenkt;
3. der Anteil gesamter TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -produzierender CD8 T-Lymphozyten war unter dem Einfluss von Ethanol in Kombination mit LPS verglichen mit der alleinigen LPS-Applikation signifikant erniedrigt.

## 6 Diskussion

**Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie sind:**

1. Die über acht Tage durchgeführte intraperitoneale Alkohol-Applikation führte bei chirurgisch behandelten Mäusen zu keinen signifikanten durchflusszytometrisch registrierten Änderungen der prozentualen Anteile von TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden Milz CD4 und CD8 T-Lymphozyten verglichen mit den mit NaCl behandelten Mäusen und Mäusen der Shamgruppe.
2. Der prozentuale Anteil TNF $\alpha$ -exprimierender Milz CD4 T-Lymphozyten wurde in Folge einer LPS-Applikation bei chirurgisch behandelten Tieren nicht verändert verglichen mit den nicht mit LPS behandelten Tieren. Der Anteil gesamter IFN $\gamma$ -positiver CD4 T-Lymphozyten wurde dabei unter dem Einfluss von LPS signifikant gesenkt.  
Bei den Milz CD8 T-Lymphozyten führte eine LPS-Gabe ebenfalls zu keinen Änderungen der Anteile der TNF $\alpha$ -produzierenden Zellenfraktion im Vergleich zu Zellen von den nicht LPS-applizierten Tieren, wobei der Anteil der IFN $\gamma$ -sezernierenden Fraktion deutlich verringert wurde.

3. Die Kombination von Alkohol- und LPS-Gabe führte bei den Milz CD4 T-Lymphozyten zu keinen Änderungen des prozentualen Anteils TNF $\alpha$ -exprimierender Zellen und zu einer signifikanten Senkung des Anteils der IFN $\gamma$ -positiven Zellen im Vergleich zu der alleinigen Alkohol-Applikation.

Bei den Milz CD8 T-Lymphozyten wurde unter dem Einfluss von der Alkohol-LPS-Kombination eine signifikante Senkung der Anteile TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierender Zellen registriert verglichen mit der Wirkung der NaCl-LPS-Kombination.

4. Beim Vergleich der Messergebnisse von der mit Kombination NaCl-LPS behandelten Gruppe zu denen von der mit Alkohol-LPS behandelten Gruppe wurden bei den Milz CD4 T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Anteile der TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellfraktionen zwischen den Gruppen nachgewiesen.

Bei den Milz CD8 T-Lymphozyten waren dagegen die Anteile der TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierender Zellen von den mit Alkohol und LPS behandelten Tieren signifikant gesenkt verglichen mit Tieren der NaCl-LPS-Gruppe.

## 6.1 Tumornekrosefaktor alpha

Behandlungsgruppen	CD4	CD8
Kontrolle - NaCl		↑
Kontrolle - Ethanol		↑
NaCl - Ethanol		
NaCl - NaCl-LPS		
Ethanol - Ethanol-LPS		↓
NaCl-LPS - Ethanol-LPS		↓

**Tabelle 8: Vergleich der FACS-Messergebnissen der TNF-alpha-positiven T-Zellen**

Mit Pfeilen ist eine signifikante Erhöhung bzw. Senkung der Werte von der zweiten Vergleichsgruppe im Vergleich zu der Ersten bezeichnet. Bei den leeren Kästchen handelt es sich um keinen nachgewiesenen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen.

### 6.1.1 TNF-alpha und Alkohol

Die FACS-Messergebnisse der TNF $\alpha$ -produzierenden Milz CD4 und CD8 T-Lymphozyten ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen der acht Tage mit Ethanol behandelten Gruppe und den Sham- und NaCl-Gruppen. Ein ähnliches Resultat wurde in der Literatur auch von anderen Forschern beschrieben. Deacius IV et al. stellten nach einer 16-Wochen-Alkoholapplikation keine Veränderungen der TNF $\alpha$ -Produktion in der Milz bei Ratten fest (31). Mendenhall et al. kamen in ihrer tierexperimentellen Studie zu dem gleichen Ergebnis nach 28 Tagen Alkohol-Gabe (86). Chen et al. behandelten Mäuse über fünf Monate mit einer alkoholhaltigen Diät und konnten ebenfalls keinen deutlichen Unterschied der TNF $\alpha$ -Produktion nachweisen (28). Andererseits liefern die Studien mit einer kürzeren Dauer der Ethanol-Applikation Ergebnisse, die dafür sprechen, dass die in einem kurzen Zeitraum applizierten hohen Alkoholdosen eher zur Verminderung der TNF $\alpha$ -Expression führen. So beschrieben Greiffenstein et al. verminderte TNF $\alpha$ -Werte in Milzzellen von Ratten, die in einem Alcohol-binge-Modell (5g/kg Ethanol 3 Tage lang) untersucht wurden (44).

Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien weisen einen Einfluss von Alkohol auf CD4-Zellen nach. Nach einer Alkohol-Applikation wurde eine verminderte Immunantwort der Th1-Helferzellen beschrieben, wobei die Th2-Zellfraktion entweder unveränderte oder gar erhöhte Funktion aufwies (72, 121, 123, 138). Da TNF $\alpha$  sowohl von Th1- als auch von Th2-Lymphozyten exprimiert wird, könnte man die Vermutung äußern, dass es bei chronischen Alkohol-Modellen zu einem Ausgleich der gesamten TNF $\alpha$ -Produktion der Th1- und Th2- CD4 T-Lymphozyten käme. Offensichtlich spielt hier der Einfluss des Alkohols auf Monozyten eine wichtige Rolle, da dabei die für die Th1-Antwort notwendige antigenpräsentierende Funktion der Monozyten vermindert und die Produktion des Th2-Zytokins IL-10 gesteigert wird, was die entsprechenden Veränderungen bei den Th1 und Th2 Immunreaktionen verursacht (41, 127).

Bei dem Vergleich der mit NaCl bzw. Alkohol behandelten Gruppen zu der Sham-Gruppe wurden bei den mit Injektionen behandelten Gruppen signifikant höhere prozentuale Anteile der nur TNF $\alpha$ -produzierenden CD8-Zellen registriert als bei der Shamgruppe. Offensichtlich spielte dabei das tägliche Stichtrauma eine Rolle, die zu Erhöhung des Anteils der TNF $\alpha$ -produzierenden CD8-Zellen führte. Der aktivierende

Einfluss von Trauma auf die TNF $\alpha$ -Expression wurde schon häufiger in der Literatur beschrieben (4, 51).

### **6.1.2 TNF-alpha und LPS**

Die TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 und CD8 T-Lymphozyten von den Tieren der mit NaCl und LPS behandelten Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied der gemessenen Zellenanteile im Vergleich zu den Zellen von den Tieren der Sham- und NaCl-Gruppen.

Bei der Auswertung der TNF $\alpha$ -Sekretionswerte spielt der Bestimmungspunkt eine besondere Rolle. Viele Forscher beschreiben von dem Zeitpunkt der Messung abhängige Differenzen bei der TNF $\alpha$ -Expression in demselben Organismus. In der Studie von Ikeda et al. demonstrierte die Bestimmung von TNF $\alpha$  bei Mäusen unmittelbar nach der LPS-Gabe einen klaren Anstieg (54). In einer Studie am Menschen wurde eine verminderte TNF $\alpha$ -Produktion direkt nach der LPS-Applikation und eine eindeutige Erhöhung der Werte nach 90 – 180 Minuten beschrieben (88). Sechs Stunden nach Infektion war der TNF $\alpha$ -Spiegel bei einer Bestimmung bereits herunter reguliert (134). In der vorliegenden Arbeit lagen zwischen der LPS-Gabe und T-Lymphozytenisolation 24 Stunden, damit wurde dieses murine Modell dem klinischen und Labor - Bild einer Infektionsentwicklung maximal angenähert, was zu den Zielen dieser Studie gehört. Zu dem ausgewählten Zeitpunkt treten in Folge einer LPS-Gabe bereits klinische Zeichen einer beginnenden Endotoxinämie in Erscheinung. Daher könnte man unter Berücksichtigung von in der Literatur beschriebenen Studienergebnissen vermuten, dass die geringen Unterschiede des TNF $\alpha$ -Spiegels in dieser Studie zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen an dem zweiten Tag nach der LPS-Applikation mit dem Messungszeitpunkt erklärt werden können. Ravindranath et al. beschrieben ebenfalls keine Veränderungen der Immunantwort von Milz-T-Lymphozyten am zweiten Tag nach der Infektion (104).

LPS wirkt auf CD4 T-Lymphozyten, indem eine stärkere Th1-Antwort hervorgerufen wird (83). Da aber TNF $\alpha$  sowohl für die Th1- als auch die Th2-Antwort charakteristisch ist, bedeutet eine verstärkte Th1-Antwort nicht unbedingt eine Steigerung der gesamten TNF $\alpha$ -Produktion von CD4 Zellen, weil die Th2-Antwort dabei verringert und die

gesamte (Th1 plus Th2) TNF $\alpha$ -Sekretion damit unverändert oder gar gesenkt sein könnte.

Da Endotoxinämie, die in dieser Studie bei den untersuchten Mäusen ausgelöst wurde, und Sepsis klinisch und pathologisch verwandte Zustände sind, ist es sinnvoll, einige in der Literatur vorhandene Ergebnisse von Studien vorzustellen, die sich mit Veränderungen des TNF $\alpha$ -Spiegels bei Sepsis befassen. Es wurde eine von der Sepsisphase abhängige Steigerung der TNF $\alpha$ -Produktion bei Patienten beobachtet, wobei die Menge des ausgeschütteten TNF $\alpha$  mit der Sterberate direkt korrelierte (15, 42). Bei tierexperimentellen Studien wurden bei einem septischen Zustand nach Caecum-Ligatur und Punktion eine Verminderung der Th1-Antwort und eine Steigerung der Th2-Antwort registriert (116). In dem Fall könnte der TNF $\alpha$ -Wert durch eine Art Ausgleich zwischen der TNF $\alpha$ -Produktion von beiden Th-Fraktionen unverändert geblieben sein, womit der geringe Unterschied zwischen der TNF $\alpha$ -Expression verschiedener Behandlungsgruppen im dargestellten Versuch erklärt werden könnte.

### **6.1.3 TNF-alpha und Alkohol-LPS-Kombination**

Die gemessenen TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 T-Zellen von den mit Alkohol behandelten Tieren verglichen mit den Zellen von den mit Alkohol und LPS behandelten Tieren wiesen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von Ethanol und LPS bei CD8 zytotoxischen T-Lymphozyten zum hochsignifikant niedrigeren prozentualen Anteil der TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen als die alleinige Ethanol-Gabe ( $p=0,000$ ).

Die supprimierende Wirkung der Alkohol-LPS-Kombination wird in der Literatur ebenfalls von anderen Forschern bestätigt. In ihrer tierexperimentellen Studie maßen Chen et al. nach zwei Wochen Alkohol-Applikation mit darauf folgender LPS-Gabe eine verminderte TNF $\alpha$ -Produktion in Milz (26). Frost et al. behandelten Ratten mit Alkohol und injizierten sie dann mit LPS-Lösung, die registrierten TNF $\alpha$ -Werte waren dabei viel niedriger als bei den nur mit LPS behandelten Tieren (37). In einer anderen murinen Studie wurde die Wirkung einer akuten Alkohol-Gabe auf die TNF $\alpha$ -Sekretion erforscht, indem chronisch alkoholisierten Tieren LPS appliziert wurde, wobei einer der zwei Versuchsgruppen unmittelbar vor Infektion eine Extradosis Alkohol injiziert wurde. Die



TNF $\alpha$ -Werte der zusätzlich akut alkoholisierten Ratten waren signifikant niedriger, als bei der anderen Behandlungsgruppe (97).

Offensichtlich spielt bei den Veränderungen der TNF $\alpha$ -Produktion unter Einfluss von der Kombination „Alkohol plus Infektion“ auch die Art der Infektion und das betroffene Organ eine gewisse Rolle. Bei einer mit *K. pneumoniae* induzierten Lungenentzündung wurde bei über acht Tagen alkoholisierten Mäusen eine erhöhte TNF $\alpha$ -Expression von CD4 und CD8 Milz T-Lymphozyten gemessen (71). In einer anderen tierexperimentellen Studie wurden die Mäuse nach einer chronischen Alkoholapplikation mit BCG (abgeschwächte Tuberkelbazillen) infiziert, die Milz-TNF $\alpha$ -Werte waren nach dieser Behandlung stark gestiegen (86). Bei der Induktion von murinem AIDS durch Infektion mit Retroviren wurde bei chronisch alkoholisierten Mäusen eine signifikante Erhöhung der TNF $\alpha$ -Produktion nachgewiesen, eine akute Alkoholgabe löste jedoch keine registrierbaren Veränderungen aus (10, 139).

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse von den zwei mit LPS behandelten Gruppen (B-III und B-IV) wurden bei CD8 T-Lymphozyten die signifikant niedrigeren prozentualen Anteile der TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen bei den alkoholisierten Mäusen im Vergleich zu den NaCl-applizierten Mäusen festgestellt ( $p=0,036$ ). Die CD4 T-Zellen wiesen dagegen zwischen diesen zwei Behandlungsgruppen keinen Unterschied bei den TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen auf.

#### **6.1.4 Schlussfolgerung**

Anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils der TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 und CD8 Milz T-Lymphozyten bei den fünf Versuchsgruppen ist erkennbar, dass eine alleinige Alkoholapplikation oder eine alleinige LPS-Gabe zu keinen Unterschieden der Anteile von den TNF $\alpha$ -exprimierenden Zellen zwischen den Behandlungsgruppen führte. Eine Kombination aus Alkohol- und LPS-Gabe bewirkte allerdings eine signifikante Senkung des Anteils von TNF $\alpha$ -produzierenden CD8-Zellen im Vergleich zur alleinigen Alkohol-Applikation oder alleinigen LPS-Gabe.

**Fazit:** *Alkohol scheint in Kombination mit LPS-Applikation die unspezifische Immunantwort zu beeinträchtigen, indem der Anteil der TNF $\alpha$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten gesenkt wird. Bei Alkoholkranken könnten auf diese Weise beim Auftreten einer Infektion ihre Weiterentwicklung und Generalisierung begünstigt werden.*

## 6.2 Interferon gamma

Gruppen	CD4	CD8
Kontrolle - NaCl	↑	↓
Kontrolle - Ethanol	↑	↓
NaCl - Ethanol		
NaCl - NaCl-LPS	(↑)↓	↓
Ethanol - Ethanol-LPS	↓	↓
NaCl-LPS - Ethanol-LPS		↓

**Tabelle 9: Vergleich der FACS-Ergebnissen der IFN-gamma-positiven T-Zellen**

Mit Pfeilen ist eine signifikante Erhöhung bzw. Senkung der Werte von der zweiten Vergleichsgruppe im Vergleich zu der Ersten bezeichnet. Bei den leeren Kästchen handelt es sich um keinen nachgewiesenen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen.

### 6.2.1 IFN-gamma und Alkohol

Die Gegenüberstellung der Messungsergebnisse der IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 Milz T-Lymphozyten brachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Alkohol und NaCl behandelten Versuchsgruppen sowohl bei den CD4 als auch bei den CD8 Zellen. In einer tierexperimentellen Studie beobachteten Chen et al. ebenfalls keine Veränderung der IFN $\gamma$ -Expression in der Milz unter Alkohol-Einfluss (28). Zahlreiche andere Forscher beschreiben eine Verminderung der IFN $\gamma$ -Produktion allerdings bei Alkoholapplikationszeiten von mehr als acht Tagen. Chadha et al. registrierten nach 14 Tagen Alkohol-Gabe eine 67-90%-ige Senkung der IFN $\gamma$ -Sekretion (24). Starkenburg et al. zeigten eine verringerte Th1-Immunreaktion mit folglich gesenkten IFN $\gamma$ -Werten nach zwölf Tagen Alkoholexposition (123). Die Beeinträchtigung der Th1-Immunantwort als Folge des Alkohol-Abusus wurde auch bei anderen Studien beschrieben (72, 138). Spies et al. beobachteten in einer klinischen Studie eine Verminderung der Th1 / Th2 Ratio bei Alkoholkranken präoperativ und eine gesenkte IFN $\gamma$  / IL-10 Ratio postoperativ (121). Offensichtlich kann auch akuter Alkoholkonsum zu Inhibition der IFN $\gamma$ -Produktion führen. Szabo et al. wiesen eine unterdrückte T-Zellproliferation und niedrige IFN $\gamma$ -Werte bei einer akuten Alkohol-

Applikation nach (127). Girouard et al. zeigten in einer Studie am Menschen eine in Folge von akutem Alkoholismus verminderte Th1 / Th2 Ratio (41).

Andererseits wurde bei Tierversuchen mit längerer Alkoholbehandlung ein gänzlich anderes Bild beschrieben. Vier Wochen lang mit einer alkoholhaltigen Diät behandelte Mäuse wiesen eine Erhöhung der IFN $\gamma$ -Produktion in der Milz auf (86). Bei einer anderen murinen Studie wurden ebenfalls gestiegene IFN $\gamma$ -Werte bei T-Lymphozyten nach einer bis 13 Wochen andauernden Alkohol-Gabe registriert, was von einer erhöhten Aktivierung der T-Zellrezeptoren hervorgerufen wurde (117).

Die vorgestellten Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass das vorliegende Modell mit einer Acht-Tage-Alkoholexposition, die keine Auswirkungen auf die IFN $\gamma$ -Expression zeigte, am ehesten einem subchronischen Modell entspricht, da sowohl eine akute als auch eine chronische Alkoholapplikation die IFN $\gamma$ -Produktion der T-Lymphozyten zu beeinflussen scheinen.

Beim Vergleich der unbehandelten Sham-Gruppe zu den NaCl oder Alkohol behandelten Mäusen sind in Folge der Injektionen einige Veränderungen der Anteile der IFN $\gamma$ -exprimierenden T-Zellen in Erscheinung getreten. Die ausschließlich IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten wiesen einen deutlich erhöhten prozentualen Anteil bei den NaCl- oder Ethanol-applizierten Tieren verglichen mit unbehandelten Mäusen auf. Der Anteil aller IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 zytotoxischen Zellen war bei Stichtrauma signifikant gesenkt. Die inhibierte IFN $\gamma$ -Expression in Folge von Traumata unterschiedlichen Ausmaßes wurde von vielen Forschern sowohl in klinischen als auch tierexperimentellen Studien beschrieben (51, 73, 145).

### 6.2.2 IFN-gamma und LPS

Die Analyse der LPS-Wirkung auf die IFN $\gamma$ -produzierenden Milz T-Lymphozyten anhand der durchflusszytometrischen Messung in fünf Versuchsgruppen ergab unterschiedliche Resultate bei den CD4 und CD8 T-Zellfraktionen.

Der prozentuale Anteil der ausschließlich IFN $\gamma$ -exprimierenden **CD4**-Zellen von den mit LPS behandelten Tieren war verglichen mit den Zellen von den nicht LPS-applizierten Tieren erhöht, der Unterschied erreichte allerdings kein signifikantes Niveau. Die Anteile von den sowohl IFN $\gamma$ - als auch TNF $\alpha$ -positiven CD4 Zellen waren nach LPS-Gabe

wiederum signifikant erniedrigt. Anscheinend ist die Ratio „IFN $\gamma$ -und-TNF $\alpha$ “-Zellen / „nur IFN $\gamma$ “-Zellen relativ hoch, da die gesamten IFN $\gamma$ -exprimierenden CD4 T-Lymphozyten ebenfalls eine signifikante Senkung des prozentualen Anteils in Folge von LPS-Gabe im Vergleich zu den Zellen von den nicht mit LPS behandelten Tieren aufwiesen; der in Folge von LPS-Applikation erhöhte Anteil der ausschließlich IFN $\gamma$ -produzierenden CD4-Zellen spielt offensichtlich bei dem zusammengerechneten Anteilwert von den gesamten IFN $\gamma$ -positiven CD4-Zellen keine große Rolle.

In der Literatur findet man unterschiedliche Aussagen über die Veränderungen der IFN $\gamma$ -Expression der CD4 Z-Lymphozyten nach einer LPS-Applikation. Nach LPS-Behandlung wurde bei Mäusen eine Erhöhung der IFN $\gamma$ -Produktion mit dem Höchstwert im Zeitabschnitt zwischen sechs und acht Stunden nach Infektion beobachtet (136). Ebenfalls wurden von LPS hervorgerufene gestiegene IFN $\gamma$ -Werte bei murinen CD4-Zellen von Srinivasan et al. beschrieben (122). Eine Studie an menschlichen Immunzellen wies eine verstärkte Th1-Immunantwort unter LPS-Einfluss und dementsprechend eine erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion sowie eine gestiegene T-Lymphozyten-Proliferation nach (83). Bei einer mit LPS induzierten Endotoxämie wurde sowohl bei einem murinen Modell als auch bei einer klinischen Studie keine Veränderung der IFN $\gamma$ -Expression registriert (25, 88). Bei Zytokinmessungen ist der ausgewählte Bestimmungszeitpunkt von Bedeutung. Ravindranath et al. registrierten eine verringerte Th1-Reaktion erst 48 Stunden nach der Infektion, nach 24 Stunden konnte dabei noch keine Veränderung nachgewiesen werden (104). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine 24 Stunden nach einer LPS-Gabe bestimmt, was eine Aussage zu der Zytokinproduktion an diesem Zeitpunkt, jedoch nicht zu der weiteren Entwicklung machen lässt.

In der Literatur sind verminderte IFN $\gamma$ -Produktionswerte bei einer inhibierten Th1-Antwort ebenso bei anderen infektiösen Zuständen beschrieben. Song et al. maßen in einem Modell mit Caecum-Ligatur und Punktion einen deutlich gesenkten IFN $\gamma$ -Spiegel (116). Bei Sepsis wurde bei Tieren ebenfalls eine verminderte Th1-Antwort beobachtet (30).

Der im FACS registrierte prozentuale Anteil der IFN $\gamma$ -produzierenden **CD8** zytotoxischen T-Lymphozyten war bei den beiden mit LPS behandelten Versuchsgruppen (B-III, B-IV) viel niedriger als bei den Gruppen, denen kein LPS-appliziert wurde, wobei dieses Ergebnis bei allen CD8-Zellfraktionen – sowohl nur IFN $\gamma$ -

als auch IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -exprimierenden – beobachtet wurde. Ein ähnliches Resultat nach einer LPS-Gabe beschrieben Pulendran et al. in einer murinen Studie, bei der außerdem die unterschiedlichen Effekte des LPS von verschiedenen Erregern gezeigt wurden (102). Bei einer Studie am Menschen wurde ebenfalls eine signifikante Senkung der Anzahl von IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 T-Zellen nach einer LPS-Behandlung nachgewiesen (75).

Die beschriebenen Studienergebnisse bestätigen damit die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate.

### 6.2.3 IFN-gamma und Alkohol-LPS-Kombination

Die kombinierte Alkohol-LPS-Applikation führte sowohl bei CD4 als auch CD8 Milz T-Lymphozyten zu viel niedrigeren prozentualen Anteilen der IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen als die alleinige Alkohol-Gabe.

Beim Vergleich der zwei mit LPS behandelten Gruppen untereinander wurden bei CD4 und CD8 T-Zellenpopulationen unterschiedliche Ergebnisse gemessen. Die IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Zellen von den mit NaCl+LPS und Alkohol+LPS behandelten Gruppen zeigten dicht aneinander liegende Werte.

Bei den CD8 T-Lymphozyten war der Anteil der IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen von der mit Alkohol-LPS-Kombination behandelten Gruppe signifikant niedriger als bei der NaCl-LPS-Gruppe ( $p=0,030$ ), wobei für diese niedrigen Werte die IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -exprimierende CD8-Zellenfraktion verantwortlich ist. Die CD8 T-Zellen, die nur IFN $\gamma$  sezernieren, wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den LPS-Versuchsgruppen auf.

Der supprimierende Effekt des Alkohols auf die IFN $\gamma$ -Produktion bei mit LPS behandelten Tieren wurde ebenfalls von Happel et al. beschrieben (48).

Auch bei Infektionen bewirkt Alkohol Veränderungen bei der IFN $\gamma$ -Sekretion. In einer experimentellen Studie wurden Mäuse mit Alkohol behandelt und anschließend mit *K. pneumoniae* infiziert, wobei eine deutliche Verringerung der IFN $\gamma$ -Expression von Milz T-Lymphozyten verglichen mit der Shamgruppe beobachtet wurde (71). Beim Behandeln mit BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) konnten Mendenhall et al. allerdings eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in der Milz von chronisch alkoholisierten Tiere feststellen (86). Offensichtlich spielt dabei der Erreger eine große Rolle - während die Gram-negativen Bakterien (wie z. B. *K. pneumoniae*), bei denen das in der

vorliegenden Arbeit verwendete LPS ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand ist, bei einer Kombination mit Alkoholkonsum die IFN $\gamma$ -Produktion supprimieren, scheinen dabei die Gram-positiven Bakterien (z.B. BCG) die IFN $\gamma$ -Expression eher anzuregen.

#### **6.2.4 Schlussfolgerung**

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Milz T-Lymphozyten in Bezug auf die IFN $\gamma$ -Produktion in unterschiedlich behandelten Versuchgruppen zeigte die folgenden Ergebnisse.

Die alleinige Alkoholisierung der Tiere ohne eine weitere LPS-Behandlung bewirkte keine Veränderungen der prozentualen Anteile der IFN $\gamma$ -sezernierenden CD4 sowie CD8 T-Lymphozyten verglichen mit den nicht alkoholisierten Tieren.

Eine LPS-Gabe löste beim Vergleich zu der LPS-freien Behandlung eine signifikante Senkung der Anteile der IFN $\gamma$ -produzierenden sowohl CD4 T-Zellen als auch CD8 zytotoxischen T-Lymphozyten aus.

Die Alkohol-LPS-Kombination führte zu einer weiteren Senkung des Anteils der IFN $\gamma$ -exprimierenden CD8 T-Zellen verglichen mit der NaCl-LPS-Kombination.

**Fazit:** *Alkohol scheint bei einer Endotoxinämie den Anteil der IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 zytotoxischen T-Lymphozyten zu senken, wodurch die unspezifische Immunantwort des betroffenen Organismus behindert werden kann. Der unvollständige Einsatz der Abwehrmechanismen kann zu einer besonderen Anfälligkeit für eine weitere Infektionsentwicklung führen.*

### **6.3 Alkohol und T-Lymphozyten**

Die Methode der durchflusszytometrischen Untersuchung der TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 Milz T-Lymphozyten, die für diese Arbeit verwendet wurde, lässt keine Aussage über die Veränderung der absoluten Anzahl von untersuchten Zellen unter dem Einfluss von unterschiedlichen Faktoren zu, sondern nur über die prozentuale Anteilsrate der Zellen in einer vorher auf eine bestimmte Zellenzahl eingestellten Zellsuspension.

Dennoch ist es von wissenschaftlichem Interesse, die in der Literatur vorhandenen Studienergebnisse zu diesem Thema zu erläutern.

Bei einer Gegenüberstellung der vorhandenen Studienergebnisse ist erkennbar, dass die Größe der CD4 und CD8 Zellpopulationen sowie die CD4 / CD8 Ratio in einer direkten Korrelation mit der Konzentration des applizierten Alkohols stehen. Während niedrigere Dosierungen von Alkohol auf die T-Lymphozyten einen stimulierenden Effekt aufweisen und zu einer Erhöhung der Zellzahl führen, zeigen dagegen die hohen Alkoholkonzentrationen eher eine supprimierende Wirkung auf T-Zellpopulationen. Guo et al. behandelten Mäuse mit 5%-igem Alkohol und beschrieben eine Erhöhung der Anzahl Milz CD4 T-Lymphozyten (47). Meadows et al. registrierten ein in Folge einer ebenfalls 5%-igen Ethanolapplikation aufgetretenes Wachstum der gesamten T-Lymphozytenpopulation in der Milz mit einer unveränderten CD4/CD8 Ratio (84). Bei einer anderen tierexperimentellen Studie mit etwas höher konzentriertem Alkohol wurde eine gesenkte Anzahl der CD4 und CD8 T-Zellen sowie eine erhöhte CD4 / CD8 Ratio nachgewiesen (108). Bei der Behandlung von Tieren mit noch höheren Alkoholkonzentrationen kann eine weitere Verminderung der T-Lymphozytenmenge in Erscheinung treten. Jerrells et al. beobachteten eine Reduzierung der Milz T-Zellenpopulation bei einer 37%-alkoholhaltigen Diät (59). Andere murine Studien wiesen eine Senkung der CD4 T-Lymphozytenzahl und eine verminderte CD4 / CD8 Ratio bei 35%- und 38%-Alkoholgehalt nach (50, 52). Jiménez et al. zeigten bei einer ähnlichen Behandlung ebenfalls eine gesenkte CD4 / CD8 Ratio mit einer Erhöhung der CD8 Zellenzahl (60). Niedrigere CD4-Zellenzahlen in Folge des Alkoholkonsums wurden auch in Studien von Chadha et al. und Shellito et al. gemessen (24, 115).

Die Reduzierung der CD4 und CD8 T-Zellpopulationen ist offensichtlich nicht nur von der Alkoholkonzentration sondern auch von der Dauer des Alkoholkonsums direkt anhängig (18). Darüber hinaus spielt auch das Geschlecht eine gewisse Rolle: Grossmann et al. beobachteten eine Senkung der CD4 T-Lymphozytenzahl nach einer Alkohol-Gabe bei männlichen Tieren, die weiblichen Tiere zeigten dagegen keine Veränderungen der CD4 Zellpopulation (46).

Diese Literaturangaben stehen in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen im Sinne einer von Alkohol verursachten Beeinträchtigung der CD4- und CD8-spezifischen Immunantwort.

## 6.4 Methodenkritik

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwiefern Alkoholkonsum die Immunantwort im Sinne seiner Auswirkungen auf die TNF $\alpha$ - und INF $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 T-Lymphozyten beeinträchtigt, und wie diese möglichen immunologischen Veränderungen die Entwicklung einer postoperativen LPS-induzierten Endotoxämie beeinflussen können. Die Experimente wurden an einem Maus-Modell durchgeführt, weswegen die erhaltenen Ergebnisse nicht vorbehaltlos auf Menschen übertragen werden können. Den Versuchstieren wurde über acht Tage 81 Ethanol pro kg Körpergewicht einmal täglich intraperitoneal verabreicht, was einer subchronischen Alkoholexposition entspricht und zu keinen Leber- und anderen Organschäden führt (18, 59, 81, 87, 123). Am achten Tag der Behandlung wurde unter Isofluran-Narkose eine mediane Laparotomie durchgeführt. Am zweiten postoperativen Tag folgte eine intraperitoneale LPS-Applikation (90). Dieser Zeitpunkt entspricht dem im Klinikalltag häufigsten Auftreten einer postoperativen Infektion (2, 8, 110, 119, 121, 137). Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Milzen isoliert. Anschließend wurden die Milz CD4 und CD8 T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie anhand der produzierten TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  untersucht, indem die prozentualen Anteile der TNF $\alpha$ - und/oder INF $\gamma$ -positiven CD4- und CD8-Zellen bestimmt wurden (65, 85). Allerdings verursacht der Alkohol nicht nur Veränderungen der Zytokinproduktion, sondern beeinflusst bekanntermaßen Veränderungen der Anzahl zytokinproduzierender T-Zellen (47, 50, 52, 59, 60, 84, 108, 115). Daher wäre es sinnvoll, neben der Bestimmung der prozentualen Anteile der TNF $\alpha$ - und INF $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten eine Untersuchung der absoluten Zellenzahl der CD4 und CD8 T-Lymphozytenpopulationen unter dem Einfluss von Ethanol und anderen Faktoren durchzuführen.

Zur Beurteilung des klinischen Zustandes von Versuchstieren wurden die Gewichte notiert sowie Motorik, Fellzustand und Schleimhäute mittels eines Drei-Punkte-Scores bewertet. Die Scores wurden anschließend je Maus und Tag summiert und ausgewertet. Da unterschiedliche Faktoren verschiedene klinisch-pathologische Symptome auslösen, wie zum Beispiel eingeschränkte Motorik nach einem chirurgischen Eingriff oder entzündete Schleimhäute bei einer Infektion, wäre es sinnvoll, alle klinischen Zeichen separat auszuwerten, was jedoch bei dieser Arbeit aufgrund kleiner Fallzahlen nicht durchführbar wäre.



Um ein ausführlicheres Bild der von Alkohol verursachten immunologischen Veränderungen zu gewinnen, wäre es sinnvoll einige weitere Untersuchungen sowie eine Verfeinerung der vorhandenen Methode vorzunehmen.

Laut der aktuellen Forschungsergebnisse ändert sich die Produktion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Verlaufe einer sich entwickelten LPS-induzierten Endotoxinämie (88, 104, 134, 136). In der vorliegenden Studie wurden die TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  24 Stunden nach einer LPS-Gabe gemessen, daher wäre es von Bedeutung die Bestimmung der oben genannten Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wie zum Beispiel 12, 24, 36 und 48 Stunden nach einer LPS-Applikation, durchzuführen. Dadurch könnten die immunologischen Veränderungen im Verlaufe einer Endotoxinämie besser beurteilt werden.

Darüber hinaus wäre eine Bestimmung von zusätzlichen Zytokinen von großer Wichtigkeit. Vor allem könnte die Bestimmung der Th2-Zytokine wie zum Beispiel IL-4 und IL-10 zusätzlich zu der vorhandenen Messung der Produktion von Th1-Zytokin IFN $\gamma$  eine Grundlage zu Beurteilung über die Veränderungen der Th1 / Th2 Ratio schaffen.

Mit Hilfe anderer Untersuchungsmethoden (PCRs, WesternBlots, Immunhistochemie) könnte ein noch vollständigeres Bild der komplexen immunmodulatorischen Auswirkungen von Alkoholexposition gewonnen werden.

## 7 Zusammenfassung

**Hintergründe:** der Anteil der Patienten mit chronischem Alkoholabusus beträgt bis zu 50% aller operativmedizinischen Patienten. Postoperative Komplikationen treten bei ihnen 2-5-mal öfter auf (58, 119, 137). Am häufigsten sind dabei infektiöse Komplikationen in Form von Wundinfektionen, Pneumonie, Peritonitis und Sepsis zu beobachten (2, 8, 110, 119, 120, 121, 137).

Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien wiesen funktionelle Beeinträchtigungen von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Monozyten/Makrophagen als Folge von akutem sowie chronischem Alkoholkonsum nach (57, 128). Alkohol verringert die Zellzahlen von T-Lymphozyten in zirkulierendem Blut, Thymus und Milz und führt zu Verminderung der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von Lymphozyten (33, 59). Alkohol hat grosse Auswirkungen

auf die Zytokinexpression, indem er die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und manchen anderen Zytokinen beeinflusst (32, 127, 128).

Laut des gegenwärtigen Forschungsstandes kann Alkoholkonsum also auf unterschiedliche Weise die Immunantwort des Körpers auf eindringende Erreger beeinträchtigen.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Alkohol und LPS einzeln sowie in einer Kombination beider Faktoren auf die TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 T-Lymphozyten aus den Milzen von operativ behandelten Mäusen untersucht.

**Methoden:** Balb/c- Mäusen wurde über acht Tage täglich 3 g Ethanol pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert (81). Das Verabreichen von Ethanol in dieser Menge über einen relativ kurzen Zeitabschnitt entspricht einer subchronischen Alkoholexposition, die zu keinen Leber- und anderen Organschäden führt (59, 87, 123).

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten anstelle des Ethanols über acht Tage i.p. Injektionen von Kochsalzlösung.

Am achten Tag wurde bei allen Tieren unter Isofluran-Narkose eine mediane Laparotomie durchgeführt. Am zweiten postoperativen Tag wurde bei zwei der Versuchsgruppen (bei den mit Alkohol bzw. NaCl behandelten) eine Endotoxinämie mittels i.p. LPS-Applikation induziert. Die Gewichte der Tiere wurden im Verlaufe des Versuchs kontrolliert und die klinischen Krankheitszeichen erhoben. Am dritten postoperativen Tag wurden allen Tieren nach der Tötung die Milz und die Leber entnommen, die Milz T-Lymphozyten wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die CD4 und CD8 T-Lymphozyten anhand der TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Produktion detektiert und analysiert. Die Untersuchung wurde in allen fünf Behandlungsgruppen mindestens 9-mal durchgeführt.

Die entnommenen Organe wurden histologisch untersucht.

**Ergebnisse:** Alkohol wies die folgenden Auswirkungen auf den klinischen Zustand der untersuchten Tiere und auf die CD8 und CD4 T-Lymphozyten.

Die klinischen Krankheitszeichen waren bei den mit Ethanol und LPS behandelten Tieren ausgeprägter als bei den Tieren, die die NaCl-LPS-Kombination erhielten. Zwischen anderen Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei den CD8 zytotoxischen T-Lymphozyten konnte eine von Alkohol hervorgerufene Beeinträchtigung der sowohl TNF $\alpha$ - als auch IFN $\gamma$ -Exprimierung nachgewiesen werden: die Alkoholapplikation kombiniert mit einer LPS-Gabe führte zu einer signifikanten Senkung der Anteile von den TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen im Vergleich zur Zusammensetzung von NaCl und LPS. Bei den nicht LPS-applizierten Tieren wurden allerdings keine Veränderungen der Anteile der TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen in Folge von Alkoholexposition verglichen mit einer NaCl-Applikation nachgewiesen. Die LPS-Gabe führte zu einer signifikanten Reduzierung des Anteils der IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten verglichen mit einer LPS-freien Behandlung, hatte jedoch keine Auswirkungen auf den Anteil der TNF $\alpha$ -produzierenden CD8 T-Zellen.

Alkohol zeigte keine Wirkung auf die prozentualen Anteile von den TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten weder bei der alleinigen Ethanol-Gabe noch bei der Applikation von der Ethanol-LPS-Kombination. In Folge der LPS-Gabe wurde bei den CD4 T-Lymphozyten verglichen mit den nicht mit LPS behandelten Tieren ein signifikant gesenkter prozentualer Anteil der IFN $\gamma$ -exprimierenden Zellen gemessen, der Anteil der TNF $\alpha$ -positiven Zellen unterschied sich jedoch von den Kontrollgruppen nicht signifikant.

Bei einer mikroskopischen Untersuchung des Lebergewebes von den Tieren der Sham-Gruppe und der Ethanol-Gruppe konnte kein histologischer Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die Milzen der mit LPS-behandelten Mäusen zeigten histologische Anzeichen einer Entzündung.

**Schlussfolgerung:** *Alkohol kann beim Auftreten einer Endotoxinämie eine Beeinträchtigung der unspezifischen Immunantwort hervorrufen, indem die Anteile von den TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -exprimierenden CD8 T-Lymphozyten signifikant gesenkt werden. Das kann zu einer besonderen Anfälligkeit für Generalisierung des pathologischen Zustandes und einer weiteren Infektionsentwicklung führen.*

*Alkohol scheint keinen Einfluss auf die Anteile der TNF $\alpha$ - und/oder IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T-Lymphozyten zu haben.*

## 8 Abkürzungsverzeichnis

a.	Arteria
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BP	Bandpassfilter
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Cy5	Indodicarbocyanin 5
d.	Ductus
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
engl.	Englisch
et al.	et alii (lat.) - und andere
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Separation
FasL	Fas Ligand
FBS	Fötales Bovines Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluorescence light
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Hour
i.p.	intraperitoneal
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Liter

lat.	Latein
LBP	LPS bindendes Protein
LL	lower left
LP	Langpassfilter
LPS	Lipopolysaccharid
LR	lower right
max.	maximal
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MOV	Multiorganversagen
NaCl	Natrium Chlorid, isotone Kochsalzlösung
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OP	Operation
PBA	Phosphate Buffered Saline plus Albumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-myristat-Azetat
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	Side Scatter
TIR-4	Toll-like-receptor 4
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNF $\beta$	Tumornekrosefaktor beta
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UL	upper left
UR	upper right
v.	Vena
vs.	versus
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit von Alkoholproblemen in der Bevölkerung der BRD .....	5
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Endotoxin-Moleküls.....	8
Abbildung 3: das optische System von FACSCalibur; modifiziert .....	23
Abbildung 4: Darstellung der durchflusszytometrisch untersuchten CD4 und CD8 T-Zellen .....	28
Abbildung 5: FACS-Darstellung der PMA/Ionomycin-stimulierten CD4 und CD8 T-Zellen .....	29
Abbildung 6: FACS-Darstellung der unstimulierten CD4 und CD8 T-Zellen .....	30
Abbildung 7: Dotplot-Darstellung der statistisch analysierten Werte der Änderungen des Gewichts der Mäuse am Präparationstag versus 1. Injektionstag .....	38
Abbildung 8: Dotplot-Darstellung der statistisch analysierten klinischen Scores am Präparationstag .....	40
Abbildung 9: Milzpräparat von einer Maus der Sham-Gruppe.....	41
Abbildung 10: Milzpräparat von einer Maus der NaCl –Gruppe .....	42
Abbildung 11: Milzpräparat von einer Maus der Ethanol-Gruppe.....	42
Abbildung 12: Milzpräparat von einer Maus der NaCl-LPS-Gruppe. ....	43
Abbildung 13: Milzpräparat von einer Maus der Ethanol-LPS-Gruppe. ....	43
Abbildung 14: Leberpräparat von einer Maus der Sham-Gruppe.....	44
Abbildung 15: Leberpräparat von einer Maus der Ethanol-Gruppe .....	44
Abbildung 16: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur TNF-alpha“-CD4 T-Zellen .....	46
Abbildung 17: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller TNF-alpha-positiven CD4 T-Zellen .....	47
Abbildung 18: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur TNF-alpha“- CD8 T-Zellen .....	48
Abbildung 19: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller TNF-alpha-positiven CD8 T-Zellen .....	49
Abbildung 20: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur- IFN-gamma“- CD4 T-Zellen .....	51
Abbildung 21: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller IFN- gamma-positiven CD4 T-Zellen .....	52
Abbildung 22: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der „nur- IFN-gamma“- CD8 T-Zellen .....	53
Abbildung 23: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten aller IFN- gamma-positiven CD8 T-Zellen .....	55

Abbildung 24: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der sowohl TNF-alpha- als auch IFN-gamma-positiven CD4 T-Zellen.....	56
Abbildung 25: Statistische Dotplot-Darstellung von den im FACS gemessenen Werten der sowohl TNF-alpha- als auch IFN-gamma-positiven CD8 T-Zellen.....	58

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtes Verlaufsschema der Tierversuche.....	18
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Instrumente .....	32
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	33
Tabelle 4: Verwendete Antikörper .....	34
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	35
Tabelle 6: Ergebnisse der FACS-Messungen von CD4 T-Lymphozyten.....	58
Tabelle 7: Ergebnisse der FACS-Messungen bei CD8 T-Lymphozyten.....	59
Tabelle 8: Vergleich der FACS-Messergebnissen der TNF-alpha-positiven T-Zellen.....	61
Tabelle 9: Vergleich der FACS-Ergebnissen der IFN-gamma-positiven T-Zellen.....	66
Tabelle 10: Die nichtparametrischen Werte der Gewichtsänderungen.....	92
Tabelle 11: Die nichtparametrischen Werte der klinischen Scores.....	93
Tabelle 12: Die nichtparametrischen Werte der TNF-alpha-positiven CD4 und CD8 T-Zellen ..	94
Tabelle 13: Die nichtparametrischen Werte der IFN-gamma-positiven CD4 und CD8 T-Zellen	95
Tabelle 14: Die nichtparametrischen Werte der TNF-alpha- und IFN-gamma-positiven CD4 und CD8 T-Zellen.....	96

# 11 Literaturverzeichnis

- (1) Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54-60.
- (2) Adams HG, Jordan C. Infections in the alcoholic. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Med Clin North Am* 1984;68(1):179-200.
- (3) Aguet M, Merlin G. Purification of human gamma interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human gamma interferon. *J Exp Med* 1987;165:988-9.
- (4) Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002;6(4):298-305.
- (5) Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release. *Arch Surg* 1994;129(11):1172-8.
- (6) Beutler B, Poltorak A. The sole gateway to endotoxin response: how LPS was identified as Tlr4, and its role in innate immunity. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(4 Pt 2):474-8.
- (7) Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-91.
- (8) Baker RC, Jerrells TR. Recent developments in alcoholism: immunological aspects. *Recent Dev Alcohol* 1993;11:249-71.
- (9) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-7.
- (10) Bautista AP, Wang E. Acute ethanol administration downregulates human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120-induced KC and RANTES production by murine Kupffer cells and splenocytes. *Life Sci.* 2002;71(4):371-82.
- (11) Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334(26):1717-25.
- (12) BD Biosciences Kataloge: Probe/Filter Combination List. 2003;189.
- (13) Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:24-34.
- (14) Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997;89(2):167-70.



- (15) Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996;77(1):110-7.
- (16) Bode C, Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(11):166-71.
- (17) Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24:163-72
- (18) Boyadjieva NI, Dokur M, Advis JP, Meadows GG, Sarkar DK. Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26(11):1719-27.
- (19) Brodsky JA, Brody FJ, Endlich B, Armstrong DA, Ponsky JL, Hamilton IA. MCP-1 is highly expressed in peritoneum following midline laparotomy with peritoneal abrasion in a murine model. *Surg Endosc* 2002; 16(7):1079-1082.
- (20) Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg* 1999;177(1):55-60.
- (21) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72(9):3666-70.
- (22) Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ, Warren HS. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immunol* 1990;58:2375-82.
- (23) Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine* 1990;2:313-29.
- (24) Chadha KC, Stadler I, Albin B, Nakeeb SM, Thacore HR. Effect of alcohol on spleen cells and their functions in C57BL/6 mice. *Alcohol* 1991;8:481-5.
- (25) Chae BS. Comparative study of the endotoxemia and endotoxin tolerance on the production of Th cytokines and macrophage interleukin-6: differential regulation of indomethacin. *Arch Pharm Res.* 2002;25(6):910-6.
- (26) Chen CP, Boyadjieva NI, Advis JP, Sarkar DK. Ethanol suppression of the hypothalamic proopiomelanocortin level and the splenic NK cell cytolytic activity is associated with a reduction in the expression of proinflammatory cytokines but not anti-inflammatory cytokines in neuroendocrine and immune cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(11):1925-32.

- (27) Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, Tateda K, Kyasapura BL, Standiford TJ. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol* 2000;165(11):6496-503.
- (28) 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):1319-26.
- (29) Coffman RL, Mosmann TR. CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res Immunol* 1991;142:7-9.
- (30) Dallal O, Ravindranath TM, Choudhry MA et al. T-cell proliferative responses following sepsis in neonatal rats. *Biol Neonate.* 2003;83(3):201-7.
- (31) Deaciuc IV, Alappat JM, McDonough KH, D'Souza NB. Effect of chronic alcohol consumption by rats on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 clearance in vivo and by the isolated, perfused liver. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(6):891-9.
- (32) Deaciuc IV. Alcohol and cytokine networks. *Alcohol* 1997;14(5):421-30.
- (33) Domiati-Saad R, Jerrells TR. The influence of age on blood alcohol levels and ethanol-associated immunosuppression in a murine model of ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17(2):382-8.
- (34) Ewald SJ, Shao H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17(2):359-65.
- (35) Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004;10(2):71-84.
- (36) Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611.
- (37) Frost RA, Nystrom G, Burrows PV, Lang CH. Temporal differences in the ability of ethanol to modulate endotoxin-induced increases in inflammatory cytokines in muscle under in vivo conditions. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29(7):1247-56.
- (38) Gery I., Krüger J, Spiesel SZ. Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T 6 T 6 thymus grafts. *J Immunol* 1972;108:1088-91.
- (39) Goodier MR, Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56+CD3- NK cells: A regulatory role of monocytes and IL-10. *J Immunol* 2000;165:139-47.
- (40) Gerosa F, Paganin C, Peritt D et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med.* 1996;183(6):2559-69.

- (41) Girouard L, Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Regulation of monocyte interleukin-12 production by acute alcohol: a role for inhibition by interleukin-10. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(1):211-6.
- (42) Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000;181(1):176-80.
- (43) Gollob JA, Kawasaki H, Ritz J. Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T cell Interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity Interleukin-12 receptor expression. *Eur J Immunol* 1997;27:647-52.
- (44) Greiffenstein P, Mathis KW, Stouwe CV, Molina PE. Alcohol binge before trauma/hemorrhage impairs integrity of host defense mechanisms during recovery. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(4):704-15.
- (45) Grell M, Zimmermann G, Gottfried E et al. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* 1999;18:3034-43.
- (46) Grossman CJ, Nienaber M, Mendenhall CL et al. Sex differences and the effects of alcohol on immune response in male and female rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17(4):832-40.
- (47) Guo TL, Zhang LX, Chen JP, Nguyen VA, White KL Jr, Gao B. Differential STAT5 activation and phenotypic marker expression by immune cells following low levels of ethanol consumption in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002;24(1):121-38.
- (48) Happel KI, Rudner X, Quinton LJ et al. Acute alcohol intoxication suppresses the pulmonary ELR-negative CXC chemokine response to lipopolysaccharide. *Alcohol.* 2007;41(5):325-33.
- (49) He XS, Rehermann B, Boisvert J et al. Direct functional analysis of epitope-specific CD8+ T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* 2001;14(1):59-69.
- (50) Helm RM, Wheeler G, Burks AW, Hakkak R, Badger TM. Flow cytometric analysis of lymphocytes from rats following chronic ethanol treatment. *Alcohol.* 1996;13(5):467-71.
- (51) Hensler T, Hecker H, Heeg K et al. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997;65(6):2283-91
- (52) Hsiung L, Wang J, Waltenbaugh C. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets of mice maintained on an ethanol-containing liquid diet. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(1):12-20.

- (53) Ijzermans JN, Marquet RL. Interferon-Gamma: A Review. *Immunobiology* 1989;179:456-73.
- (54) Ikeda M, Hamada K, Sumitomo N, Okamoto H, Sakakibara B. Serum amyloid A, cytokines, and corticosterone responses in germfree and conventional mice after lipopolysaccharide injection. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Jun;63(6):1006-10.
- (55) Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147(927):258-67.
- (56) Janeway CA, Travers P. *Immunologie*, 2. Auflage, Spektrumverlag 1997.
- (57) Jayasinghe R, Gianutsos G, Hubbard AK. Ethanol-induced suppression of cell-mediated immunity in the mouse. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;16(2):331-5.
- (58) 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* 1998;15:19-22.
- (59) Jerrells TR, Smith W, Eckardt MJ. Murine model of ethanol-induced immunosuppression. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14(4):546-50.
- (60) Jiménez V, Cardinali DP, Alvarez MP, Fernández MP, Boggio V, Esquifino AI. Effect of chronic ethanol feeding on 24-hour rhythms of mitogenic responses and lymphocyte subset populations in thymus and spleen of peripubertal male rats. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(6):357-65.
- (61) Kägi D, Ledermann B, Bürki B et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369:31-7.
- (62) Kägi D, Vignaux F, Ledermann B et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-30.
- (63) Kamei K, Nimura Y, Nagino M, Aono K, Nakashima I. Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 386(7):512-517.
- (64) Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001;92:1322-6.
- (65) Kern F, Faulhaber N, Frömmel C et al. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1676-82.
- (66) Kitazawa T, Nakatani Y, Fujimoto M, Tamura N, Uemura M, Fukui H. The production of tumor necrosis factor-alpha by macrophages in rats with acute alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27(8):72-5.

- (67) 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* 1998;22:157-62.
- (68) Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26(l):124-8.
- (69) Loppnow H, Libby P. Adult human vascular endothelial cells express the IL-6 gene differently in response to LPS and IL-1. *Cell Immunol.* 1989;122:493-503.
- (70) Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* 1998;160:3861-8.
- (71) Lanzke N, Kleinwächter 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.* 2007;12(1):59-68
- (72) Latif O, Peterson JD, Waltenbaugh C. Alcohol-mediated polarization of type 1 and type 2 immune responses. *Front Biosci.* 2002;7:a135-47.
- (73) Lemaire LC, van der Poll T, van Lanschot JJ et al. Minimally invasive surgery induces endotoxin-tolerance in the absence of detectable endotoxemia. *J Clin Immunol* 1998;18:414-20.
- (74) Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor. *Histol Histopathol* 2000;15:1303-25
- (75) Loh LC, Vyas B, Kanabar V, Kemeny DM, O'Connor BJ. Inhaled endotoxin in healthy human subjects: a dose-related study on systemic effects and peripheral CD4+ and CD8+ T cells. *Respir Med.* 2006;100(3):519-28..
- (76) Mann K. Neue ärztliche Aufgaben bei Alkoholproblemen. *Deutsches Ärzteblatt* 2002;99(10):632-44.
- (77) Marcucci F, Waller M, Kirchner H, Krammer P. Production of Immune Interferon by murine T-cell clones from long-term cultures. *Nature* 1981;291:79-81.
- (78) Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock* 2001;16(1):10-5.
- (79) Martins GA, Da Gloria Da Costa Carvalho M, Rocha Gattass C. Sepsis: a follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *Int J Mol Med* 2003;11(5):585-91.
- (80) Mason CM, Dobard E, Kolls J, Nelson S. Effect of alcohol on bacterial translocation in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(8):1640-5.

- (81) Mason CM, Dobard E, Kolls JK, Nelson S. Ethanol und murine interleukin (IL)-12 production. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24(4):553-9.
- (82) Mattern T, Flad HD, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ. Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *J Immunol.* 1998;160(7):3412-8.
- (83) Mattern T, Thanhäuser A, Reiling N. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol.* 1994;153(7):2996-3004.
- (84) Meadows GG, Wallendal M, Kosugi A, Wunderlich J, Singer DS. Ethanol induces marked changes in lymphocyte populations and natural killer cell activity in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 1992;16(3):474-9.
- (85) Meisel C, Bonhagen K, Löhning M et al. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol.* 2001;166(5):3143-50.
- (86) Mendenhall CL, Finkelman F, Means RT Jr et al. Cytokine response to BCG infection in alcohol-fed mice. *Alcohol.* 1999;19(1):57-63.
- (87) Mendenhall CL, Rouster SD, Roselle GA et al. Impact of chronic alcoholism on the aging rat: changes in nutrition, liver composition, and mortality. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17(4):847-53.
- (88) Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 1988;318(23):1481-6.
- (89) Milner EC, Rudbach JA, von Eschen KB. Cellular responses to bacterial lipopolysaccharide: T cells recognize LPS determinants. *Scand J Immunol* 1983;18:21-8.
- (90) Moreira AL, Wang J, Sarno EN, Kaplan G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. *Braz J Med Biol Res* 1997;30(10):1199-1207.
- (91) Morris AG, Morser J, Meager A. Spontaneous Production of Gamma Interferon and induced production of beta interferon by human T-lymphoblastoid cell lines. *Infect Immun* 1982;35:533-6.
- (92) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
- (93) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.

- (94) Murphey ED, Traber DL. Protective effect of tumor necrosis factor-alpha against subsequent endotoxemia in mice is mediated, in part, by interleukin-10. *Crit Care Med* 2001;29(9):1761-6.
- (95) Napolitano LM, Koruda MJ, Zimmerman K, McCowan K, Chang J, Meyer AA. Chronic ethanol intake and burn injury: evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity. *J Trauma* 1995;38(2):198-207.
- (96) Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79:319-26.
- (97) Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Summer WR. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J Infect Dis* 1989;160(3):422-9.
- (98) O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(1):37-45.
- (99) Ozdemir A, Oygur N, Gultekin M, Coskun M, Yegin O. Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1a, interleukin-1b and interleukin-6 response to infection. *Am J Perinatol* 1994;11:282-5.
- (100) Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol*. 2000;32(5):742-7.
- (101) Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:331-60.
- (102) Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol*. 2001;167(9):5067-76.
- (103) Radbruch A. *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer Verlag 2000.
- (104) Ravindranath T, Al-Ghoul W, Namak S et al. Effects of burn with and without *Escherichia coli* infection in rats on intestinal vs. splenic T-cell responses. *Crit Care Med*. 2001;29(12):2245-50.
- (105) Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001;29(7):121-5.
- (106) Rietschel ET. Chemical structure and biological activity of endotoxins (lipopolysaccharides) and lipid A. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1975;287(1):73-84.
- (107) Rübenach SP et al. Die Erfassung alkoholbedingter Sterbefälle in der Todesursachenstatistik 1980 bis 2005. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2007.

- (108) Saad AJ, Jerrells TR. Flow cytometric and immunohistochemical evaluation of ethanol-induced changes in splenic and thymic lymphoid cell populations. *Alcohol Clin Exp Res*. 1991;15(5):796-803.
- (109) Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995;2(3):271-9.
- (110) Sander M, Neumann T, von Dossow V et al. Alcohol use disorder: risks in anesthesia and intensive care medicine. *Der Internist* 2006;47(4):332-41.
- (111) Schietroma M, Carlei F, Cappelli S, Amicucci G. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 2006;243(3):359-63.
- (112) Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 1995;164(6):383-9.
- (113) Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-59.
- (114) Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry* 4. Edition. Wiley-Liss 2003.
- (115) Shellito JE, Olariu R. Alcohol decreases T-lymphocyte migration into lung tissue in response to *Pneumocystis carinii* and depletes T-lymphocyte numbers in the spleens of mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(3):658-63.
- (116) Song GY, Chung CS, Chaudry IH, Ayala A. IL-4-induced activation of the Stat6 pathway contributes to the suppression of cell-mediated immunity and death in sepsis. *Surgery*. 2000;128(2):133-8.
- (117) Song K, Coleman RA, Zhu X et al. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*. 2002;72(6):1109-16.
- (118) Spies C, Tønnesen H, Andreasson S, Helander A, Conigrave K. Perioperative morbidity and mortality in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(5 Suppl ISBRA):164-70.
- (119) Spies CD, Nordmann A, Brummer G et al. Intensive care unit stay is prolonged in chronic alcoholic men following tumor resection of the upper digestive tract. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996;40(6):649-56.
- (120) Spies CD, Rommelspacher H. Alcohol withdrawal in the surgical patient: prevention and Treatment. *Anesth Analg* 1999;88(4):946-54.
- (121) Spies CD, von Dossow V, Eggers V et al. Altered cellmediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. *Anesthesiology* 2004;100(5):1088-100.



- (122) Srinivasan A, Salazar-Gonzalez RM, Jarcho M, Sandau MM, Lefrancois L, McSorley SJ. Innate immune activation of CD4 T cells in salmonella-infected mice is dependent on IL-18. *J Immunol.* 2007;178(10):6342-9.
- (123) Starckenburg S, Munroe ME, Waltenbaugh C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(8):1221-30.
- (124) Stewart WE 2nd, Blalock JE, Burke DC et al. Interferon Nomenclature. *J Immunol.* 1980;125:2353.
- (125) Suda T, Okazaki T, Naito Y et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol.* 1995;154(8):3806-13.
- (126) Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985;230:943-5.
- (127) 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 $\gamma$  levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(12):1766-72.
- (128) Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol* 1999;34(6):830-41.
- (129) Tannahill CL, Fukuzuka K, Marum T, Abouhamze Z, MacKay SL, Copeland EM, III et al. Discordant tumor necrosis factor-alpha superfamily gene expression in bacterial peritonitis and endotoxemic shock. *Surgery* 1999;126(2):349-57.
- (130) Tonnesen H, Kehlet H. Preoperative alcoholism and postoperative morbidity. *Br J Surg* 1999;86(7):869-74.
- (131) Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251-76.
- (132) Trinchieri G. Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin Immunol* 1995;7:83-8.
- (133) Tyring S, Klimpel GR, Fleischmann WRJr, Baron S. Direct cytolysis by partially-purified preparations of immune interferon. *Int J Cancer* 1982;30:59-64.
- (134) van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis.* 1996;174(6):1356-60.

- (135) van Der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 1995;3(1):1-12.
- (136) Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(3):530-43.
- (137) von Heymann C, Langenkamp J, Dubisz N et al. Posttraumatic immune modulation in chronic alcoholics is associated with multiple organ dysfunction syndrome. *J Trauma* 2002;52(1):95-103.
- (138) Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin. Exp Res* 1998;22(5):220-3.
- (139) Wang Y, Huang DS, Giger PT, Watson RR. Ethanol-induced modulation of cytokine production by splenocytes during murine retrovirus infection causing murine AIDS. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17(5):1035-9.
- (140) West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit. Care Med* 2002;30(1):64-73.
- (141) Wong GH, Clark-Lewis I, McKimm-Breschkin L, Harris AW, Schrader JW. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J Immunol* 1983;131(2):788-93.
- (142) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249(4975):1431-3.
- (143) Yip YK, Barrowclough BS, Urban C & Vilcek J. Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferons. *Science* 1982;215:411-3.
- (144) Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999;27(1):66-72.
- (145) Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 1995;4(2):149-53.
- (146) Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998;392:296-300.
- (147) 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* 1998;22:621-7.

- (148) Zubler RH, Werner-Favre C, Wen L, Sekita K, Straub C. Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems. Immunol Rev 1987;99:281-99.
- (149) Skizze „Das optische System des FACSCalibur“ [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Pathologie/labor\\_durchflusszytometrie/labor\\_durchflusszytometrie1.htm#1](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Pathologie/labor_durchflusszytometrie/labor_durchflusszytometrie1.htm#1)

## 12 Anhang

### 12.1 Tabellarische Darstellung der nichtparametrischen statistischen Werte

Gruppen		Gewichtsänderung 1.Tag versus OP- Tag	Gewichtsänderung 1.Tag versus 1.Post-OP Tag	Gewichtsänderung 1.Tag versus 2.Post-OP Tag	Gewichtsänderung 1.Tag versus Präp Tag
NaCl	N	15	15	15	15
	Mittelwert	,9467	,2667	,4867	,8067
	Median	1,0000	,3000	,6000	,9000
	Standardabweichung	,59984	,60198	,49838	,55481
	Minimum	,00	-1,00	-,50	-,10
	Maximum	1,90	1,20	1,30	1,40
	Perzentile 25	,5000	-,2000	,0000	,3000
	50	1,0000	,3000	,6000	,9000
75	1,4000	,8000	,9000	1,3000	
EtOH	N	14	14	14	14
	Mittelwert	,4929	,0929	,4429	,7000
	Median	,6500	-,0500	,6500	,7000
	Standardabweichung	,61076	,78785	,81591	,80096
	Minimum	-,40	-,90	-1,10	-,80
	Maximum	1,50	2,10	1,80	2,10
	Perzentile 25	-,2000	-,5250	-,2750	,2000
	50	,6500	-,0500	,6500	,7000
75	,8250	,4750	,9250	1,2500	
NaCl+LPS	N	12	12	12	12
	Mittelwert	,3750	-,0833	,0667	-1,9000
	Median	,3500	,1000	,2000	-1,9500
	Standardabweichung	,87295	,59975	,44992	,43485
	Minimum	-1,00	-1,40	-,70	-2,70
	Maximum	2,00	,80	,80	-1,20
	Perzentile 25	-,0750	-,3750	-,2500	-2,2000
	50	,3500	,1000	,2000	-1,9500
75	,9250	,2750	,3500	-1,4500	
EtOH+LPS	N	10	10	10	10
	Mittelwert	,1500	-,3800	-,0100	-1,9200
	Median	,0000	-,4000	,1000	-1,9000
	Standardabweichung	,56421	1,14095	,58775	,40497
	Minimum	-,60	-2,70	-1,10	-2,70
	Maximum	1,20	1,20	,90	-1,30
	Perzentile 25	-,3000	-1,0500	-,5250	-2,1500
	50	,0000	-,4000	,1000	-1,9000
75	,5750	,5500	,4250	-1,7000	

**Tabelle 10: Die nichtparametrischen Werte der Gewichtsänderungen**

Die Tabelle zeigt die nichtparametrischen Werte der Änderungen vom Gewicht der Tiere von vier Behandlungsgruppen an dem Operationstag, dem ersten und dem zweiten postoperativen Tagen sowie dem Präparationstag verglichen mit dem ersten Versuchstag.

Gruppen		Score 1.PostOP Tag	Score 2.PostOP Tag	Score Präp Tag
Kontrolle	N	9	9	9
	Mittelwert	4,00	2,11	1,78
	Median	4,00	2,00	2,00
	Standardabweichung	,000	,333	,441
	Minimum	4	2	1
	Maximum	4	3	2
	Perzentile	25	4,00	2,00
	50	4,00	2,00	2,00
	75	4,00	2,00	2,00
NaCl	N	15	15	15
	Mittelwert	3,87	2,27	1,73
	Median	4,00	2,00	2,00
	Standardabweichung	,352	,704	,458
	Minimum	3	2	1
	Maximum	4	4	2
	Perzentile	25	4,00	2,00
	50	4,00	2,00	2,00
	75	4,00	2,00	2,00
EtOH	N	14	14	14
	Mittelwert	3,79	2,14	1,57
	Median	4,00	2,00	2,00
	Standardabweichung	,426	,535	,514
	Minimum	3	2	1
	Maximum	4	4	2
	Perzentile	25	3,75	2,00
	50	4,00	2,00	2,00
	75	4,00	2,00	2,00
NaCl+LPS	N	12	12	12
	Mittelwert	3,92	2,33	5,33
	Median	4,00	2,00	5,00
	Standardabweichung	,289	,651	,492
	Minimum	3	2	5
	Maximum	4	4	6
	Perzentile	25	4,00	2,00
	50	4,00	2,00	5,00
	75	4,00	2,75	6,00
EtOH+LPS	N	10	10	10
	Mittelwert	3,90	2,00	5,90
	Median	4,00	2,00	6,00
	Standardabweichung	,316	,000	,316
	Minimum	3	2	5
	Maximum	4	2	6
	Perzentile	25	4,00	2,00
	50	4,00	2,00	6,00
	75	4,00	2,00	6,00

**Tabelle 11: Die nichtparametrischen Werte der klinischen Scores**

Die Tabelle zeigt die nichtparametrischen Werte der klinischen Scores an dem ersten und dem zweiten postoperativen Tagen sowie an dem Präparationstag von Tieren aller Behandlungsgruppen.

Gruppen		nur TNF $\alpha$	TNF $\alpha$	nur TNF $\alpha$	TNF $\alpha$
		CD4	CD4 gesamt	CD8	CD8 gesamt
Kontrolle	N	9	9	9	9
	Mittelwert	69,1922	73,3567	19,5967	47,5978
	Median	67,7700	72,0400	20,2500	48,6800
	Standardabweichung	3,39715	3,34697	3,35691	5,32649
	Minimum	64,83	68,94	13,66	38,01
	Maximum	75,59	79,49	25,98	53,27
	Perzentile	25 66,6150 50 67,7700 75 71,7700	70,7050 72,0400 75,8100	17,5450 20,2500 20,9500	43,5450 48,6800 52,9100
NaCl	N	15	15	15	15
	Mittelwert	69,1833	73,3667	25,4260	43,2093
	Median	69,1800	74,5400	26,4600	42,3300
	Standardabweichung	3,05101	3,02002	5,53130	8,37288
	Minimum	62,42	65,61	18,78	31,25
	Maximum	72,64	76,15	38,77	62,83
	Perzentile	25 66,8600 50 69,1800 75 71,9800	71,4100 74,5400 75,7400	20,2300 26,4600 28,3300	38,2400 42,3300 48,8700
EtOH	N	14	14	14	14
	Mittelwert	68,0414	72,2236	27,0950	44,3307
	Median	69,8500	74,4250	27,1150	44,9700
	Standardabweichung	4,77847	5,09447	2,29988	6,58865
	Minimum	59,06	62,67	22,97	28,62
	Maximum	74,83	78,80	31,15	54,75
	Perzentile	25 63,9275 50 69,8500 75 71,2825	66,9625 74,4250 75,6475	26,0525 27,1150 28,3325	41,9175 44,9700 48,2825
NaCl-LPS	N	12	12	12	12
	Mittelwert	69,0458	71,8283	27,4417	42,0525
	Median	68,1250	71,3550	27,2750	41,7850
	Standardabweichung	4,39296	4,59143	5,53512	10,49850
	Minimum	62,26	65,42	19,63	28,46
	Maximum	75,71	78,71	37,43	64,50
	Perzentile	25 66,2400 50 68,1250 75 73,3550	68,4475 71,3550 75,8300	22,7300 27,2750 30,3450	32,9275 41,7850 46,4450
EtOH-LPS	N	10	10	10	10
	Mittelwert	68,9440	71,2580	23,4780	33,0840
	Median	69,1250	71,6600	23,7950	33,9050
	Standardabweichung	3,58673	3,81470	4,78911	6,12081
	Minimum	61,92	63,93	15,73	22,25
	Maximum	73,41	75,62	30,48	40,24
	Perzentile	25 66,1375 50 69,1250 75 72,0375	68,0550 71,6600 74,5950	19,1650 23,7950 27,2775	27,1950 33,9050 38,7425

**Tabelle 12: Die nichtparametrischen Werte der TNF-alpha-positiven CD4 und CD8 T-Zellen**  
Die Tabelle zeigt die nichtparametrischen Werte der prozentualen Anteilsrate von den in allen Behandlungsgruppen gemessenen TNF $\alpha$ -produzierenden CD4 und CD8 T- Lymphozyten.

Gruppen		nur IFN $\gamma$ CD4	IFN $\gamma$ CD4 gesamt	nur IFN $\gamma$ CD8	IFN $\gamma$ CD8 gesamt
Kontrolle	N	9	9	9	9
	Mittelwert	,7600	4,9244	17,9500	45,9511
	Median	,7500	4,9200	17,6200	47,0200
	Standardabweichung	,13077	,30582	3,58260	4,31350
	Minimum	,53	4,43	12,11	39,39
	Maximum	,95	5,46	24,80	52,55
	Perzentile	25	,6900	4,6850	15,9000
	50	,7500	4,9200	17,6200	47,0200
	75	,8800	5,1050	20,0650	48,4950
NaCl	N	15	15	15	15
	Mittelwert	1,0820	5,2653	12,9940	30,8740
	Median	1,1200	5,2600	13,3800	31,7900
	Standardabweichung	,22517	,78079	3,03997	4,78441
	Minimum	,66	4,07	6,94	22,25
	Maximum	1,46	7,00	17,90	37,11
	Perzentile	25	,9300	4,5700	10,3200
	50	1,1200	5,2600	13,3800	31,7900
	75	1,1700	5,8100	15,7600	35,2000
EtOH	N	14	14	14	14
	Mittelwert	1,1214	5,3179	11,4186	28,6543
	Median	1,1250	5,2650	12,4800	31,9200
	Standardabweichung	,21067	,92174	3,41844	9,16773
	Minimum	,78	3,33	4,28	9,75
	Maximum	1,58	6,59	16,62	38,33
	Perzentile	25	,9875	4,7275	9,4625
	50	1,1250	5,2650	12,4800	31,9200
	75	1,2375	6,0500	13,3300	34,9750
NaCl-LPS	N	12	12	12	12
	Mittelwert	1,1975	3,9800	9,9667	24,5775
	Median	1,3100	3,7550	10,0050	22,9300
	Standardabweichung	,32991	,85212	1,80979	6,53993
	Minimum	,60	2,68	7,28	16,98
	Maximum	1,60	5,19	12,99	38,39
	Perzentile	25	,9000	3,3100	8,3150
	50	1,3100	3,7550	10,0050	22,9300
	75	1,4175	4,7525	11,6000	28,8975
EtOH-LPS	N	10	10	10	10
	Mittelwert	1,2390	3,5540	8,9620	18,5680
	Median	1,1950	3,6300	9,2450	18,8400
	Standardabweichung	,28073	,45004	1,58574	2,92322
	Minimum	,76	2,85	5,54	12,06
	Maximum	1,71	4,26	10,84	23,46
	Perzentile	25	1,0525	3,1050	8,3075
	50	1,1950	3,6300	9,2450	18,8400
	75	1,4750	3,8050	10,0625	20,2675

**Tabelle 13: Die nichtparametrischen Werte der IFN-gamma-positiven CD4 und CD8 T-Zellen**

Die Tabelle zeigt die nichtparametrischen Werte der prozentualen Anteilsrate von den in allen Behandlungsgruppen gemessenen IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 und CD8 T-Lymphozyten.

Gruppe		„TNFα -und-IFNγ“	„TNFα -und-IFNγ“
		CD4	CD8
Kontrolle	N	9	9
	Mittelwert	4,1644	28,0011
	Median	4,1300	27,7700
	Standardabweichung	,27587	3,36723
	Minimum	3,81	20,83
	Maximum	4,64	32,17
	Perzentile	25 50 75	3,9050 4,1300 4,4050
NaCl	N	15	15
	Mittelwert	4,1833	17,7847
	Median	4,2200	18,3600
	Standardabweichung	,70584	4,33001
	Minimum	3,19	11,95
	Maximum	5,87	24,38
	Perzentile	25 50 75	3,4900 4,2200 4,6100
EtOH	N	14	14
	Mittelwert	4,1964	17,2357
	Median	4,2500	18,9050
	Standardabweichung	,77950	5,96850
	Minimum	2,48	5,47
	Maximum	5,38	24,33
	Perzentile	25 50 75	3,7300 4,2500 4,7950
NaCl-LPS	N	12	12
	Mittelwert	2,7825	14,6108
	Median	2,7600	12,6200
	Standardabweichung	,74161	5,86062
	Minimum	1,86	8,83
	Maximum	3,98	28,93
	Perzentile	25 50 75	2,0125 2,7600 3,4425
EtOH-LPS	N	10	10
	Mittelwert	2,3140	9,6060
	Median	2,2700	9,9750
	Standardabweichung	,40363	1,76788
	Minimum	1,58	6,52
	Maximum	2,97	12,67
	Perzentile	25 50 75	2,0700 2,2700 2,6050

**Tabelle 14: Die nichtparametrischen Werte der TNF-alpha- und IFN-gamma-positiven CD4 und CD8 T-Zellen**

Die Tabelle zeigt die nichtparametrischen Werte der prozentualen Anteilsrate von den in allen Behandlungsgruppen gemessenen TNFα- und IFNγ-positiven CD4 und CD8 T- Lymphozyten



## 13 Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Claudia Spies für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die persönliche Unterstützung herzlich bedanken.

Nadine Lanzke danke ich für die Betreuung, wissenschaftliche und persönliche Unterstützung sowie für die Freundschaft.

Ich bedanke mich bei Mario Menk für seine Hilfsbereitschaft.

Den Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe MINA möchte ich meinen herzlichen Dank für die angenehme Zusammenarbeit, vielfältige Unterstützung und Freundschaft aussprechen.

Vielen Dank an alle Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtung von Virchow Klinikum für die fürsorgliche Pflege der Mäuse.

Meinen Freunden danke ich für die Teilnahme und die schöne Zeit, die wir miteinander verbracht haben.

Meiner Mutter Luiza Ashikyan, meinem Vater Yeghishe Sargsyan und meiner Schwester Rubina Manukjan möchte ich für die große liebevolle Unterstützung in allen Bereichen sowie für ihre Liebe und Geduld danken.

## **14 Lebenslauf**

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

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

## 15 Publikationsliste

Lanzke N, Kleinwächter R, Kerschischnik S, Sargsyan L, Groneberg DA, Kamradt T, Liesenfeld O, Krenn V, Sander M, Spies C.

**Differential effects of ethanol on IFN-gamma- and TNF-alpha-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia.**

Addiction Biology. 2007;12(1):59-68.

## 16 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Lilit Sargsyan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen von Alkohol auf Interferon-gamma und Tumornekrosefaktor-alpha produzierende Milz CD4+ und CD8+ Lymphozyten bei Lipopolysaccharid-induzierter Endotoxinaemie am operativen Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift