

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Chirurgie  
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Der Einfluss akuter Alkoholintoxikation auf die posttraumatische  
Immunantwort nach Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin

der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Jan-Niklas Franz

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referentin: Prof. Dr. Borna Relja

Korreferent: Prof. Dr. Volkhard Kempf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassungen .....</b>	<b>4</b>
1.1 Zusammenfassung in englischer Sprache.....	4
1.2 Zusammenfassung in deutscher Sprache.....	6
<b>2. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Übergreifende Zusammenfassung .....</b>	<b>10</b>
3.1 Einleitung .....	10
3.1.1 Methodik .....	18
3.1.2 Ergebnisse .....	24
3.2 Diskussion der Gesamtergebnisse und deren Beitrag zur Beantwortung der Fragestellung.....	30
<b>4. Literaturverzeichnis der übergreifenden Zusammenfassung ....</b>	<b>43</b>
<b>5. Publikation.....</b>	<b>53</b>
5.1 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen.....	53
5.2 Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation.....	55
5.3 Zur Veröffentlichung angenommene Publikationen .....	57
<b>6. Lebenslauf .....</b>	<b>78</b>
<b>7. Schriftliche Erklärung .....</b>	<b>80</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>81</b>

# 1. Zusammenfassungen

## 1.1 Zusammenfassung in englischer Sprache

The mortality course of polytraumatized patients follows a biphasic model with an early peak of deaths occurring within hours after trauma and being caused by fatal injuries of the central nervous system or hemorrhagic shock; and a delayed peak, that is linked to immunoregulatory dysfunctions including distinct hyperinflammation and subsequent (multi) organ failure. Particularly patients with thoracic injuries or suffering from a hemorrhagic shock (HS) are at risk for such complications in their later clinical course. Alcohol (mis)use plays a significant role in trauma. Although in the last two decades the number of alcohol-caused accidents declined, alcohol is the most frequent cause of detrimental injuries in young people (18-34 years of age). Aside from its well-known effects, alcohol influences the development and prognosis of infectious diseases in the clinical course through its immunomodulatory properties. Trauma patients with an acute alcohol intoxication without signs for a chronic alcohol abuse have a reduced early mortality after accidents compared to chronic abusers. The current literature uncovers the controversial role of alcohol in post-traumatic immunomodulation, with either “positive” effects in acute setting versus negative effects in a chronic setting.

Tissue-derived monocytes like pulmonary alveolar macrophages (AM) or circulating polymorphonuclear leukocytes (PMNL), especially neutrophil granulocytes play important roles in the post-traumatic inflammatory response. As example, after sensing danger molecules monocytes activate inflammasomes and caspase-1 with subsequent processing, activation and secretion of pro-inflammatory interleukin (IL)-1 $\beta$ . This highly inflammatory process of programmed cell-death is called pyroptosis. Upon their activation by inflammatory and chemotactic stimuli, neutrophils as well infiltrate inflamed tissues via modulating their surface receptors e.g. CD11b, CD62L and CD31. With their prolonged lifespan and their tissue accumulation they enhance the inflammation at the site of infection/injury. Consequently, the biological host defense mechanisms themselves lead to a loss of cellular and organ integrity. The underlying pathomechanisms have been linked to the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. Interestingly, acute alcohol exposure is suggested to inhibit NF- $\kappa$ B, and thereby to reduce inflammation *in vitro*. Thus, to examine the influence of acute alcohol (mis)use, we used a clinically relevant double hit model consisting of blunt chest trauma and a

hemorrhagic shock with subsequent resuscitation (TxT+H/R). Female LEWIS-rats received a single-dose of ethanol (5 g/kg, 30% EtOH) two hours prior H/R. Then, two hours after resuscitation the role of PMNL and monocytes in the development of pulmonary tissue damage was analyzed.

In line with previous studies, our data show that TxT+H/R induces histopathological damage in lungs that was confirmed by increased concentration of total protein in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL), increased local inflammation and infiltration with PMNL, and a marked systemic activation of neutrophils and monocytes. Neutrophils showed a significant reduction of their surface expression of CD62L as well as an increase of CD11b and CD31. In circulating monocytes, an activation of inflammasomes was evident by activated caspase-1. The analysis of active effector caspases of apoptosis, caspase-3 and -7 showed a significantly reduced apoptosis in circulating PMNL. Oral gavage with EtOH significantly reduced pulmonary inflammation and damage, that was confirmed by a decreased PMNL infiltration, decreased levels of IL-6 gene expression and a reduced protein content in BAL. Whilst the reduced BAL protein content demonstrated a diminished lung injury, histopathological examinations could not confirm this. Acute EtOH influenced the expression of surface adhesion receptors, thus confirming the reduced activation of circulating neutrophils. The reduced inflammatory activation was also shown by the reduced activation of inflammasome.

Taken together, our data demonstrate that acute alcohol (mis)use reduces local and systemic immune response in a clinically relevant double hit trauma model. The reduced systemic inflammation constituted in a decreased activation of inflammasomes in circulation monocytes and neutrophils, as well as in a diminished change of their surface receptor expression. The reduced local inflammatory response in lung tissue as well as pulmonary damage is potentially influenced by the reduced systemic activation of the corresponding inflammatory cells by alcohol. Further studies are needed to elucidate the detailed pathways of ethanol's immunomodulatory mode of action after severe trauma with special regard to the severity of trauma as well as the severity of alcohol intoxication. Furthermore, the kinetics of alcohol's influence on the immune system after trauma and the connection of local and systemic inflammatory processes need to be addressed in upcoming studies.

## 1.2 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Schwerverletzte Patienten folgen einem biphasischen Mortalitätsmuster, mit einem ersten frühen Mortalitätsgipfel aufgrund von schweren Verletzungen des zentralen Nervensystems oder durch massiven Blutverlust. Der zweite, später auftretende Traumatod ist mit einer immunologischen Dysregulierung verbunden, welche durch eine ausgeprägte Inflammation häufig im (Multi)-Organversagen endet. Insbesondere thorakale Verletzungen sowie das Erleiden eines hämorrhagischen Schocks prädisponieren den Organismus für die Entwicklung von pulmonalen Komplikationen im klinischen Folgeverlauf. Alkohol spielt hierbei eine wichtige Rolle. In den vergangenen 15 Jahren hat sich zwar die Anzahl der „Alkoholunfälle“ mit Personenschaden reduziert, dennoch tritt Alkohol als eine der häufigsten Unfallursachen bei 18-34jährigen auf. Zudem hat Alkohol durch seine immunmodulatorischen Eigenschaften einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung und Prognose von (infektiösen) Komplikationen im klinischen Folgeverlauf. Verunfallte Patienten mit einer akuten Alkoholintoxikation zeigen im Vergleich zu chronisch Alkoholisierten eine verringerte 24-Stunden-Letalität nach Trauma. Die Studienlage zu den Hintergründen ist äußerst kontrovers, und stellt den Kern der vorliegenden Arbeit dar. Eine zentrale Rolle in der Genese der post-traumatisch inflammatorischen Immunantwort nehmen die Monozyten, sowie die Alveolarmakrophagen (AM) in der Lunge, aber auch zirkulierende polymorphonukleäre Leukozyten (PMNL) insbesondere neutrophile Granulozyten ein. Die Monozyten aktivieren bspw. über die Inflammasomassemblierung Caspase-1 (Pyroptose), die das inaktive Interleukin (IL)-1 $\beta$  in seine aktive Form prozessiert, aktiviert und seine Sezernierung induziert. Neutrophile Granulozyten, die ebenfalls durch inflammatorische und chemotaktische Reize aktiviert werden, infiltrieren durch Modifikationen ihrer Oberflächenrezeptoren wie CD11b, CD62L und CD31 entzündetes Gewebe. Am Ort der „Schädigung“ weisen sie eine prolongierte Lebensspanne auf, und tragen durch ihre verstärkte Akkumulation so zu einem hyper-inflammatorischen Zustand bei. Folglich wird das eigene Gewebe geschädigt, was im Verlust der Zell- und Organintegrität enden kann. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen wurden in diversen Studien mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B assoziiert. Interessanterweise konnte die anti-inflammatorische Wirkung einer akuten Alkoholexposition mit der Hemmung des NF- $\kappa$ B, aber auch mit einer reduzierten Inflammasomassemblierung *in vitro* assoziiert werden.

Für die Untersuchung der akuten Alkoholwirkung wurde ein klinisch relevantes *double hit* Modell bestehend aus stumpfen Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock mit anschließender Flüssigkeitstherapie (TxT+H/R) genutzt. Um den Einfluss von Alkohol auf die posttraumatische Immunantwort mit Fokus auf die Rolle der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der Genese pulmonaler Schädigungen zu untersuchen, erfolgte im vorliegenden Modell eine akute Gabe von Ethanol (5 g/kg, 30%, EtOH) zwei Stunden vor Hämorrhagie und Reperfusion. Zwei Stunden nach Reperfusion wurden die inflammatorischen Prozesse und das *Outcome* der Tiere untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass TxT+H/R zu diffusen histopathologischen Lungenschäden führt, welche mit einer erhöhten Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL), verstärkter Infiltration des Lungengewebes mit PMNL sowie einer systemischen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verbunden war. Neutrophile Granulozyten zeigten eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression von CD62L und einen signifikanten Anstieg von CD11b und CD31; in zirkulierenden Monozyten konnte eine Inflammasomaktivierung durch direkten Nachweis der aktiven Caspase-1 gezeigt werden. Die Analyse der aktiven Effektorcaspasen der Apoptose Caspase-3 und -7 zeigte eine reduzierte Apoptose in zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Orale Gavage EtOH reduzierte signifikant die lokale Inflammation in der Lunge, welche mit einer verminderten PMNL Infiltration, verminderten IL-6 Genexpression und reduziertem BAL Proteingehalt einherging. Während die reduzierte Proteinkonzentration in der BAL durchaus für einen verminderten Lungenschaden spricht, war dieser histopathologisch nicht feststellbar. Systemisch modulierte die akute EtOH-Gabe Oberflächenrezeptorexpression auf zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, was deren reduzierte Aktivierung bestätigt. Die verminderte inflammatorische Aktivierung von zirkulierenden Monozyten und Granulozyten zeigte sich ebenfalls in der reduzierten Inflammasomaktivität.

Wir konnten wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Genese von pulmonalen Komplikationen nach TxT und HS, sowie die immunmodulatorischen Eigenschaften von Alkohol auf das angeborene Immunsystem darstellen. Die akute Alkoholexposition reduzierte die systemische Immunantwort, welcher in diesem klinisch relevanten Kombinationstrauma vermutlich eine reduzierte lokale Inflamationsantwort folgte. In weiterführenden Studien sollten die zugrundeliegenden Signalwege, Einfluss der Traumachwere sowie der Schwere der Alkoholintoxikation untersucht werden.

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

AIS: *abbreviated injury scale*

AM: Alveolarmakrophagen

ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ARDS: *acute respiratory distress syndrome*

AT2: Alveolarepithelzell-Typ 2

BAL: bronchoalveoläre Lavage

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

CAE: Chloracetat-Esterase-Färbung

CD: *cluster of differentiation molecule*

Caspase: *cysteiny-l-aspartate specific protease*

CINC: *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*

DAMPs: *damage-associated molecular patterns*

DNA: *deoxyribonucleic acid*

EtOH: Ethanol

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

FasL: FasLigand

fMLP: *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*

HE: Hämatoxylin-Eosin

H/R: *hemorrhage/resuscitation*

HS: hämorrhagischer Schock

IL: Interleukin

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

ISS: *injury severity score*

LPS: Lipopolysaccharid

MAC: *macrophage-antigen complex*

Mcl-1: *myeloid leukemia cell differentiation protein*

MFU: *mean fluorescence units*

MIP: *macrophage-inflammatory protein*  
MODS: *multi organ disfunction syndrome*  
MOV: Multiorganversagen  
mRNA: *messenger ribonucleic acid*  
NaCl: Natriumchlorid  
NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NLRP3: *nucleotide-binding domain, leucine-rich-repeat-containing family, pyrin domain-containing 3*  
NOD: *nucleotide oligomerization domain*  
PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*  
PBS: *phosphate-buffered saline*  
PMNL: Polymorphoneukleäre Leukozyten  
PECAM: *platelet endothelial cell adhesion molecule*  
PRR: *pattern recognition receptors*  
qRT-PCR: *quantitative real time polymerase chain reaction*  
RNA: *ribonucleic acid*  
ROS: *reactive oxygen species*  
RT: Raumtemperatur  
SHT: Schädel-Hirn Trauma  
sL-Selectin: *soluble L-Selectin*  
TEM: *transendothelial migration*  
TLR: *toll-like-receptor*  
TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*  
TxT: Thoraxtrauma  
ZNS: Zentrales Nervensystem

### 3. Übergreifende Zusammenfassung

#### 3.1 Einleitung

Traumatische Verletzungen sind eine der führenden Todesursachen weltweit mit über 5 Millionen Toten jährlich, für junge Patienten unter 35 Jahren sogar der häufigste Grund für Tod und Invalidität.<sup>1,2</sup> Die Kosten für die persönliche Invalidität, den Verlust der Arbeitskraft und der Langzeitfolgen für die medizinische Versorgung belaufen sich alleine in den USA auf bis zu 580 Milliarden Dollar pro Jahr.<sup>3</sup> Die hohe Sterblichkeit nach Trauma ist multifaktoriell bedingt. Für einen frühen Mortalitätsgipfel innerhalb von einer Stunde nach Trauma sind vor allem Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der mit einem unkontrollierten Blutverlust einhergehende hämorrhagische Schock (HS) verantwortlich.<sup>4</sup> Etwa ein Drittel bis die Hälfte der Patienten im HS erreichen das Krankenhaus nicht lebend.<sup>5</sup> Bei Aufnahme im Krankenhaus zeigen sich relevante Verletzungen mit einem *abbreviated injury scale* (AIS) über 3 überwiegend am Schädel (47%) und am Thorax (46%).<sup>6</sup> Ein weiterer Mortalitätsgipfel ist ab Tag 3 im klinischen Folgeverlauf zu beobachten.<sup>4,7</sup> Ursächlich für diesen ist eine immunologische Dysregulation, welche mit einer starken lokalen und systemischen Entzündungsreaktion sowie konsekutivem Gewebeschaden einhergeht und für bis zu 30% der schwerverletzten Patienten mit Multiorganversagen (MOV) und Tod endet.<sup>8</sup> Vor allem relevante stumpfe Thoraxtraumata (TxT) und HS durch den Unfallmechanismus prädisponieren für die Entwicklung von MOV im klinischen Verlauf.<sup>8-10</sup> Besonders vom Verlust der Organintegrität nach Trauma betroffen ist die Lunge. Sowohl bei Traumapatienten mit Multi- als auch Einzelorganversagen während des Krankenhausaufenthaltes ist die Lunge nach dem ZNS und dem kardiovaskulären System das häufigste insuffiziente Organ.<sup>8</sup> Eine besonders schwere Form der Lungeninsuffizienz ist die *acute lung injury* (ALI) bzw. das *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), welche mit beidseitigen pulmonalen Infiltraten und proteinreichen Ödemen, einem Verlust der alveolär-kapillaren Barriere und respiratorischem Versagen einhergeht.<sup>11</sup> Ein ARDS kann ebenfalls nach Pneumonien, Aspiration oder extra-pulmonaler Sepsis auftreten und ist immer noch mit einer Letalität von bis zu 40% assoziiert.<sup>12-14</sup>

Seit der ersten Beschreibung der Mortalitätsgipfel nach Trauma durch Trunkey *et al.*<sup>15</sup> konnte durch Verbesserung der Patientenversorgung am Unfallort, Konzepten wie der *damage-control-surgery*<sup>16</sup> und verbesserter Diagnostik und Versorgung während der

frühen Phase der Hospitalisierung die frühe Mortalität nach Trauma in den letzten Jahren deutlich gesenkt werden.<sup>4,8</sup> MOV hingegen verbleibt, mit bis zu 30% Mortalität, Hauptgrund für den späten Tod nach Trauma und eine Herausforderung für behandelnde Ärzte und Wissenschaftler.<sup>17</sup>

Auch übermäßiger Alkoholkonsum ist eine große Belastung für die Gesundheitssysteme weltweit. 2010 war Alkoholkonsum der drittgrößte Risikofaktor der globalen Krankheitslast,<sup>18</sup> zwischen 1990 und 2010 stieg die Zahl der durch Alkohol bedingten Tode weltweit um mehr als 20%.<sup>18</sup> Dosisabhängig erhöht regelmäßiger Alkoholkonsum unter anderem das Risiko für Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes, Leber-Karzinome, Depressionen, Epilepsie, arterielle Hypertonie und koronare Herzerkrankungen.<sup>19,20</sup> Neben den eher allgemein hin bekannten schädlichen Folgen längerfristigen Alkoholkonsums erhöht gerade akuter Alkoholkonsum hingegen auch Häufigkeit und Schwere von erlittenen Traumata. So verdoppelt bereits ein alkoholisches Getränk das Risiko traumatischer Verletzungen.<sup>21</sup> Eine Auswertung der Daten aus insgesamt 37 chirurgischen Notaufnahmen aus 18 Ländern zeigte, dass akuter Alkoholkonsum für 16 bis 36 Prozent aller erlittenen Verletzungen verantwortlich war.<sup>22</sup> In verschiedenen Studien konnten unter anderem erhöhte Risiken für Gewaltverbrechen, Stürzen mit Verletzungsfolge und Verkehrsunfälle unter Alkoholeinfluss gezeigt werden.<sup>22-26</sup> Insbesondere bei Verkehrsunfällen ging eine akute Alkoholintoxikation der verunfallten Personen mit einer signifikant erhöhten Verletzungsschwere, gemessen am ISS, und einer bis zu vierfach erhöhten posttraumatischen Mortalität einher.<sup>27-30 31,28,29,27,30</sup> Interessanterweise hat Alkoholkonsum vor Trauma jedoch auch Einfluss auf die Inzidenz von infektiösen und immunologischen Komplikationen wie Pneumonien, dem ARDS der Lunge und auch MOV im klinischen Folgeverlauf. Dies wird durch seine immunmodulatorische Funktion verursacht. Während chronischer Alkoholkonsum mit einer erhöhten Rate an Pneumonien, Sepsis und *multi organ disfunction syndrome* (MODS) einhergeht,<sup>32,33</sup> ist eine akute Intoxikation mit einer erniedrigten Interleukin (IL)-6 Konzentration und Leukozytenzahl bei Aufnahme und einer Reduzierung der 24h-Mortalität sowie der Verweildauer auf Intensivstation nach Trauma assoziiert.<sup>32,34</sup> Da seine Einflussnahme auf die posttraumatischen Entzündungsantwort nach einem Thoraxtrauma in Kombination mit einem hämorrhagischen Schock nicht erforscht ist, soll die vorliegende Arbeit die Pathomechanismen in der Entstehung von pulmonalen Schäden nach Trauma und den Einfluss von akuter Alkoholexposition auf die

Aktivierung und Rekrutierung von PMNL, die bei eben dieser Pathologie – wie nachstehend beschrieben – eine wesentliche Rolle spielen, untersucht werden.

Die Entstehung der pulmonalen Komplikationen nach Trauma ist Gegenstand aktueller Forschung. Posttraumatischer Lungenschaden entsteht im Zusammenspiel aus verschiedenen physio- und pathologischen Prozessen. Lungenkontusionen als mechanischer Reiz und hypoxische Gewebezustände durch mikrozirkuläre Störungen beeinträchtigen die Zellintegrität,<sup>35,36</sup> fördern die Freisetzung von sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aus dem Zellinneren<sup>37</sup> und führen zu einem Zustand milder Aktivierung in neutrophilen Granulozyten.<sup>38</sup> DAMPs sind physiologisch funktionale Zell- und Molekülstrukturen, welche außerhalb ihres angestammten Milieus vom angeborenen Immunsystem als schädlich erkannt werden und zusammen mit den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), Bestandteilen von Pathogenen, eine pro-inflammatorische Immunantwort erzeugen. Diese ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von Immunzellen wie Monozyten, gewebsständigen Makrophagen, Dendritischen Zellen und vor allem zirkulierenden Leukozyten wie den Polymorphonukleären Leukozyten (PMNL) und die konsekutive Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen.<sup>9,10</sup> Ist der Untergang vitalen Gewebes und die Verlagerung von Erregerbestandteilen in die Zirkulation relevant, erfahren die aktivierten zirkulierenden PMNL, insbesondere die neutrophilen Granulozyten, einen *second hit* und migrieren im Folgenden an den Ort der Entzündung.<sup>9</sup> Hier akkumulieren sie und führen dort durch ihre Abwehrstrategien wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, Myeloperoxidase und Proteinase, welche physiologischerweise dem Schutz vor Erregern und Mikroben dienen, zum Untergang vitaler Zellen sowie Gewebes und letztlich zum Verlust der Organintegrität mit häufig nachfolgendem MOV.<sup>39-41</sup>

Als erste Schutzbarriere des angeborenen Immunsystems wirken in der Lunge die Monozyten und Alveolarmakrophagen (AM),<sup>42</sup> welche zum einen für die Phagozytose und Eliminierung von eingedrungenen Erregern, auf der anderen Seite aber auch für die Beseitigung von Geweberesten und abgestorbenen Zellen verantwortlich sind. Auf ihrer Oberfläche exprimieren diese Zellen spezifische Rezeptoren, die sogenannten *pattern-recognition receptors* (PRR), welche DAMPs und PAMPs erkennen, binden und folglich eine Signalkaskade einleiten, die in einer nachfolgenden inflammatorischen Kaskade resultiert. So kommt es beispielsweise zur Ausbildung von intrazellulären Multiproteinkomplexen, der sogenannten Inflammasome, Aktivierung von *cysteinyl-*

*aspartate specific protease* (Caspase)-1 und der Aktivierung und Sezernierung von IL-1 $\beta$  oder IL-18.<sup>43,44</sup> Für die Vermittlung der Immunantwort nach Bakterien- und DAMP-Kontakt im Menschen ist insbesondere das *nucleotide-binding domain, leucine-rich-repeat-containing family, pyrin domain-containing 3* (NLRP3)-Inflammasom verantwortlich.<sup>43,45</sup> Es besteht aus *nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor* Proteinen, dem Verbindungsprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und pro-Caspase-1.<sup>43</sup> Für die Aktivierung des Inflammasoms hat sich ein zweistufiges Modell etabliert, bestehend aus *priming* und Aktivierung, allerdings ist die Inflammasomaktivierung zelltypabhängig.<sup>43</sup> Für die Vermittlung des *priming* Signals durch mikrobielle oder Zellstrukturen zeigen sich vor allem toll-like receptors (TLR) verantwortlich, eine Untergruppe der PRR-Familie, sowie unter anderem *tumor necrosis factor alpha* und IL-1 $\beta$  über ihre korrespondierenden Rezeptoren.<sup>46</sup> Nach Binden ihrer Liganden aktivieren diese den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B).<sup>43</sup> Dieser stellt ein Schlüsselmolekül der pro-inflammatorischen Immunantwort dar. Nach Aktivierung transloziert er in den Zellkern und induziert u.a. die vermehrte Transkription und Translation von Nlrp3, pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18.<sup>43,47</sup> Im zweiten Schritt führen Signale wie ATP, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Komplementfaktoren und Veränderungen der Kalium- und Kalziummembranpotentiale zur Assemblierung der Inflammasombestandteile und autolytischen Spaltung und Aktivierung von pro-Caspase-1 zu Caspase-1, welche dann pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL18 in ihre reifen, aktiven Formen überführt.<sup>48-50</sup> Zudem induziert Caspase-1 eine pro-inflammatorische Form des programmierten Zelltodes, die Pyroptose. Pyroptotische Zellen sezernieren mit dem ASC-Bestandteil des Inflammasoms gefüllte mikrometer-große Partikel, welche von benachbarten Zellen und Makrophagen aufgenommen werden und in diesen zur erneuten Inflammasombildung und so zur Amplifikation der Inflammation führen.<sup>43,51</sup> Da IL-1 $\beta$  die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B stark erhöht, tragen beide über einen positiven Feedback-Mechanismus autoregulatorisch zur Amplifikation bei.<sup>52</sup> So kommt dem Inflammasom eine Schlüsselrolle in der pro-inflammatorischen Immunantwort nach Trauma zu. Bereits 2009 konnten Gasse *et al.* im Tierversuch eine DAMP-abhängige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms nachweisen, welche in einer erhöhten IL-1 $\beta$ -Sekretion resultierte.<sup>53</sup> Verschiedene Tiermodelle bestätigten die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Entwicklung der LPS-induzierten ALI.<sup>54</sup> Im Serum von Patienten mit Trauma- und Sepsis-induzierter ALI konnten erhöhte mRNA-Spiegel für Caspase-1, IL-1 $\beta$  und IL-18 gezeigt werden.<sup>55</sup> Xu *et*

*al.* zeigten zudem eine vermehrte NLRP3-Aktivierung in Lungenendothelzellen und Alveolarmakrophagen im Kombinationsmodell aus hämorrhagischem Schock und LPS-induzierter ALI.<sup>56</sup>

Neben IL-1 $\beta$  und IL-18 führt die NF- $\kappa$ B Aktivierung in Monozyten und AM zur Sezernierung weiterer pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine wie TNF- $\alpha$ ,<sup>57</sup> IL-6,<sup>58</sup> IL-8,<sup>59</sup> *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC)-1,<sup>60</sup> *macrophage-inflammatory protein* (MIP)-1 *alpha* und MIP-1 *beta*,<sup>61</sup> welche die Inflammation verstärken und zur Rekrutierung von PMNL aus der Zirkulation führen.<sup>42</sup> Insbesondere nach stumpfen TxT sezernieren phagozytierende AM mehr TNF- $\alpha$  und CINC-1.<sup>62</sup> Bereits 1993 konnten Donnelly *et al.* nachweisen, dass in der BAL von Patienten mit ARDS signifikant erhöhte Werte von IL-8 zu finden sind, welche von AM sezerniert werden.<sup>13</sup> IL-8 führt dosisabhängig zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe und verlängert dort deren Überlebensspanne durch Reduktion der Apoptose.<sup>11,63</sup> Modig *et al.* konnten bei Patienten mit ARDS eine direkte Korrelation der Krankheitsschwere mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL zeigen.<sup>64</sup> Auch für den Plasmaspiegel von IL-6 zeigte sich bei der Auswertung von Traumapatienten eine signifikante Korrelation mit der Verletzungsschwere und dem Überleben nach Trauma.<sup>65</sup>

Die Aktivierung und Verlagerung von neutrophilen Granulozyten aus den Gefäßen in das entzündete und verletzte Gewebe, auch *transendothelial migration* (TEM) genannt, wird u.a. durch Modulation und Interaktion von Zelladhäsionsproteinen auf der Oberfläche von PMNL und dem betroffenen Endothel bewirkt.<sup>66,67</sup> Selectine wie E-, P- und L-Selectin vermitteln die ersten Schritte der Leukozytenadhäsionskaskade, das „Fangen“ und Binden der Leukozyten an das Endothel und „Rollen“ entlang von diesem.<sup>66,68</sup> Vom Endothel präsentierte Chemokine führen die Leukozyten in einen Zustand verstärkter Aktivierung und bestärken weiter ihre Bindung an das Endothel durch Integrine<sup>69,70</sup> wie den heterodimeren Komplex *macrophage-antigen complex* (MAC)-1, bestehend aus *cluster of differentiation molecule* (CD)-11b (Integrin  $\alpha_M$ ) und CD18 (Integrin  $\beta_2$ ). Mac-1 und sein endothelständiger Rezeptor *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 bewirken nun das *crawling* der Leukozyten entlang des Endothels in Richtung Endothel-Zell/Zell-Kontakte.<sup>71,72</sup> TEM kann zum sowohl para-, als auch transzellulär ablaufen, wobei Leukozyten bevorzugt zu mehr als 80% parazellulär migrieren.<sup>67</sup> Eine herausragende Rolle bei der parazellulären TEM hat CD31, auch *platelet endothelial cell*

*adhesion molecule* (PECAM)-1, welches in hoher Dichte an den lateralen Begrenzungen der Endothelzellen und in geringerem Maße auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert ist.<sup>73</sup> Homophile Interaktionen vermitteln die Auflösung der Endothel-Zell/Zell-Verbindungen und die Migration in darunter liegendes, entzündetes Gewebe.<sup>67,74</sup> Die Änderung der Expression dieser Marker auf Leukozyten und Endothelzellen und die folgende Aggravierung der neutrophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe ist ein wichtiger Mechanismus der Immunantwort nach Trauma und Inflammation und Gegenstand aktueller Therapieforschung im Rahmen des posttraumatischen MOV.<sup>63,75,76</sup>

Eine weitere Ursache für die Schädigung vitalen Gewebes durch neutrophile Granulozyten ist die Verlängerung ihrer Lebensdauer durch Verringerung der Apoptoserate. Unter physiologischen Bedingungen verbleiben neutrophile Granulozyten nach Austritt aus dem Knochenmark sechs bis 10 Stunden in der Zirkulation, bis sie in Gewebe migrieren, sich dort innerhalb von ein bis zwei Tagen der Apoptose unterziehen und durch residuale Makrophagen phagozytiert werden.<sup>77,78</sup> Dies trägt zur Erhaltung des nicht-entzündlichen Gewebezustandes bei. So sezernieren beispielsweise AM, die PMNL phagozytieren, weniger pro-inflammatorische und stattdessen anti-inflammatorische Zytokine.<sup>62,79</sup> Die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten an Orten der Entzündung und Entwicklung von ARDS nach Trauma, hämorrhagischem Schock oder Endotoxämie ist mit einer Verringerung der Apoptose assoziiert.<sup>11,80-83</sup> *In vitro* zeigte sich nach Trauma eine deutlich verlängerte Lebensdauer von PMNL im Vergleich zu PMNL von gesunden Probanden, ebenso zeigte sich in der BAL von ARDS-Patienten ein Anteil von unter 10% apoptotischer PMNL im Vergleich zu 37% in der BAL von gesunden Probanden.<sup>84,85</sup> Dies konnte in *in vitro* Studien auf pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1 $\beta$  und IL-8 zurückgeführt werden.<sup>77</sup> Mit der Verlängerung der Lebensspanne durch inflammatorische Reize geht auch eine Verlängerung der Funktionalität von PMNL und deren potenzielle Schädigung des Gewebes einher.<sup>86</sup>

Alkohol hat sowohl Einfluss auf Unfallmechanismen und Mortalität nach Trauma, als auch auf die Entwicklung von Komplikationen im klinischen Folgeverlauf. Bei der Auswertung von über 37.000 Verkehrsunfällen zeigte sich eine Verdopplung der Mortalität am Unfallort und Verletzungsschwere bei akut intoxikierten Patienten.<sup>30</sup> Im klinischen Folgeverlauf ist chronischer Alkoholkonsum nach Trauma mit einer bis zu

zweifach erhöhten Rate an Komplikationen wie Pneumonie, respiratorischer Insuffizienz, ARDS und MOV verknüpft, was zu erhöhter Liegedauer auf Intensivstation, erhöhten Krankenhaustagen und Krankenhausmortalität führt.<sup>32,87</sup> Ausschließlich akuter Alkoholkonsum hingegen führt zu einer verminderten 24-Stunden-Mortalität und verkürzter Liegezeit nach Trauma<sup>32,87</sup> und zeigt bereits bei Aufnahme der Patienten im Krankenhaus einen immunsuppressiven Effekt, der sich in verminderten systemischen IL-6 Spiegeln und Leukozytenzahlen darstellt.<sup>34,88</sup> Im Tierversuch zeigte sich nach Alkoholapplikation in klinisch relevanten Dosen eine Verminderung des durch HS bedingten Lebergewebes Schadens mit Verbesserung des Überlebens nach 72 Stunden von 20% auf 80%, was mit verminderter lokaler Infiltration mit PMNL, reduzierten lokalen IL-6 und TNF- $\alpha$  Spiegeln sowie erniedrigtem systemischen IL-6 einherging.<sup>89,90</sup> *In vitro* zeigte sich nach Ethanolgabe eine verminderte LPS-induzierte IL-8, TNF- $\alpha$  und IL-1 Ausschüttung im Monozyten als auch eine verminderte Adhäsionsrate von PMNL an Lungenepithelzellen und verminderte IL-6-induzierte IL-8 Sezernierung.<sup>91,92</sup> Die immunsuppressive Wirkung von Alkohol beginnt bereits bei der Bildung von IL-1 $\beta$  und IL-18 durch das Inflammasom. Hoyt *et al.* konnten nachweisen, dass Ethanol und andere kurzkettige Alkohole die Zusammenlagerung des Nlrp3 Inflammasoms durch Stimulation von Phosphatasen verhindert.<sup>93</sup> Dies führte zu einer unter anderem zu einer verminderten Caspase-1 Aktivierung und Sezernierung von reifem IL-1 $\beta$ , als auch zu einer verminderten ASC Sekretion und ROS Produktion nach LPS-Stimulation.<sup>93</sup> Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Alkohol in Lungenepithelzellen den kanonischen Weg der NF- $\kappa$ B Aktivierung über dessen p50 Untereinheit, nicht aber den nicht-kanonischen Weg über die p52 Untereinheit hemmt, was zu einer verminderten IL-1 $\beta$  induzierten IL-6 Sezernierung und PMNL Adhäsion führte.<sup>94</sup> Nach intratrachealer *S. pneumoniae* Applikation senkte Alkohol den Gehalt an CINC, MIP-2 und PMNL in der BAL von Mäusen und verhinderte die Heraufregulierung von CD11b auf neutrophilen Granulozyten, ein Effekt der auch nach Kontakt mit dem bakteriellen Tripeptid *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP) beobachtet wurde.<sup>95,96</sup> Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt nicht nur über die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und dem *priming* bei der Bildung des Inflammasoms eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der inflammatorischen Antwort nach Trauma, er vermittelt auch weiterhin die Expression von Integrinen und PMN Adhäsionsproteinen wie P-Selectin,<sup>97</sup> E-Selectin,<sup>98</sup> ICAM-1<sup>99</sup> und gewinnt so an umfassender Bedeutung für die Genese von ARDS und MOV im klinischen Folgeverlauf.

Da Alkoholkonsum mit einer signifikanten Zahl der traumabedingten Krankenhauseinweisungen assoziiert ist und auch Einfluss auf die Verletzungsschwere und demnach den Gewebeschaden hat, haben wir in dieser Arbeit das Verhalten von neutrophilen Granulozyten und zirkulierenden Monozyten in Bezug zur Integrität der Lunge nach Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf die Fragestellung gelegt, wie sich akute Alkoholintoxikation auf die systemische und lokale Immunantwort in der frühen posttraumatischen Phase und den konsekutiv resultierenden Schaden am Lungenparenchym auswirkt. Zur Evaluierung der systemischen Inflammation wurde die Caspase-1 Aktivität in zirkulierenden Monozyten und Granulozyten, sowie die Aktivierung der zirkulierenden Granulozyten anhand ihrer Oberflächenantigene gemessen. Zur Darstellung der lokalen Inflammation im Lungengewebe wurden in der vorliegenden Arbeit die IL-6 Genexpression in der Lunge als auch die Anzahl der infiltrierten PMNL im Lungengewebe gemessen. Der resultierende Gewebeschaden wurde histologisch und über die Messung des Proteingehaltes in der entnommenen BAL ausgewertet. Desweiteren wurde der Einfluss des vorliegenden Kombinationstraumas auf die Apoptoserate in zirkulierenden Granulozyten und deren Modulierbarkeit durch Alkoholexposition gemessen.

## Darstellung der Publikationen

### 3.1.1 Methodik

#### Auswahl und Vorbereitung der Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Ratten des Stammes Lewis mit einem Gewicht von 190 bis 240 g (Janvier Labs, Frankreich) verwendet, welche mindestens eine Akklimatisierungsphase von 7 Tagen absolviert hatten. Die Haltungsbedingungen entsprachen den Vorgaben der zentralen Forschungseinrichtung für Tierversuche des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang-Goethe-Universität. Die Tiere wurden zu maximal viert in einem Käfig auf Trockenstreu gehalten. Die Temperatur im Tierstall betrug konstant zwischen 22 und 24 Grad Celsius bei einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Trockenfutter entfernt und zur Vermeidung von Hypoglykämien durch ein Zuckergel ersetzt, die Wasserversorgung erfolgte weiterhin *ad libitum*.

Haltung und Versuche sind vom Veterinärsamt des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigt (Aktenzeichen: FK/1028)

Zwei Stunden vor Versuchsbeginn erhielten die Tiere entweder Alkohol (5 g/kg Körpergewicht, 30% Ethanol, EtOH) oder eine Kochsalz-Lösung in äquivalenter Menge (NaCl 0,9%) *via oraler Gavage*.<sup>89,100</sup>

#### Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden randomisiert den vier Versuchsgruppen zugeteilt und dem chirurgischen Procedere unterzogen. Die Gruppenzuteilung ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Gruppe	Bezeichnung	Beschreibung
1	<i>sham vehicle</i>	Versuchstiere mit oraler NaCl-Gavage; kein Thorax-Trauma, kein hämorrhagischer Schock, keine Reperfusion,

		operative Eingriffe wie in 3 und 4
2	<i>sham</i> EtOH	Versuchstiere mit oraler EtOH-Gavage; kein Thorax-Trauma, kein hämorrhagischer Schock, keine Reperfusion, operative Eingriffe wie in 3 und 4
3	TxT+H/R <i>vehicle</i>	Versuchstiere mit oraler NaCl-Gavage vor Thorax-Trauma, hämorrhagischem Schock und Reperfusion
4	TxT+H/R EtOH	Versuchstiere mit oraler EtOH-Gavage vor Thorax-Trauma, hämorrhagischem Schock und Reperfusion

**Tabelle 1:** Gruppenzuteilung der Versuchstiere.

### **Narkose und Blutdruckmessung**

1,5 Stunden nach EtOH- oder NaCl-Gavage erhielten die Tiere Buprenorphin zur Analgesie (0,05 mg/kg Körpergewicht). Die Narkose erfolgte mittels eines Isofluran/Sauerstoffgemischs (1,2 - 3,0% Isofluran-Anteil), welches *via* Nasenmaske appliziert wurde. Im Anschluss wurden Abdomen, Brust, rechte Leisten- und Nackenregion rasiert sowie die Einschnittstellen mit Carbostesin infiltriert, die rechte Femoral-Arterie zwecks Blutdruckmessung mit Polyethylen-Kathetern (Sterican® Einmal-Kanülen, 0,45\*25mm, B.Braun) kanüliert, und während des gesamten Versuchablaufs der Blutdruck intravasal abgeleitet. (Sirecust 960, Siemens AG).

### **Durchführung des Thorax-Traumas**

Nach Narkotisierung wurden die Tiere in Rückenlage auf der Arbeitsfläche fixiert. Über ihnen wurde mit einem Abstand von 6 cm ein Zylinder platziert, welcher durch einen

Film aus Mylar Polyester (0.190 mm DuPont Teijin Films Luxemburg) in 2 Kammern getrennt wurde. Durch Druckluft mit 13 Bar (Flaschendruckminderer, Zinser, Ebersbach) wurde die Membran bei Expiration perforiert (Hochgeschwindigkeitsventil Hee-D-24, Festo, Esslingen) und so eine standardisierte Druckwelle erzeugt, welche auf den Thorax gerichtet war.<sup>100-102</sup> Das Abdomen wurde mit Hilfe einer Plexiglasabdeckung geschützt. Sofort nach Applikation des Traumas erfolgte die Blutdruckmessung *via arteria femoralis*.

### **Induktion des hämorrhagischen Schocks und Reperfusion**

Nach einer Stabilisierungsphase von zwei Minuten wurden sowohl die linke *vena jugularis* als auch die rechte *arteria carotis* mit Polyethylen-Kathetern kanüliert. Innerhalb von 5 Minuten wurde der hämorrhagische Schock durch gleichmäßigen Blutentzug über die rechte *arteria carotis* induziert. Das Blut wurde in eine heparinisierte 10 ml Spritze aspiriert, bis ein mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) von  $35 \pm 3$  mm Hg erreicht wurde. Der MABP wurde durch beständiges Aspirieren und Reperfundieren von kleinen Blutmengen über 60 Minuten konstant gehalten.<sup>103,104</sup>

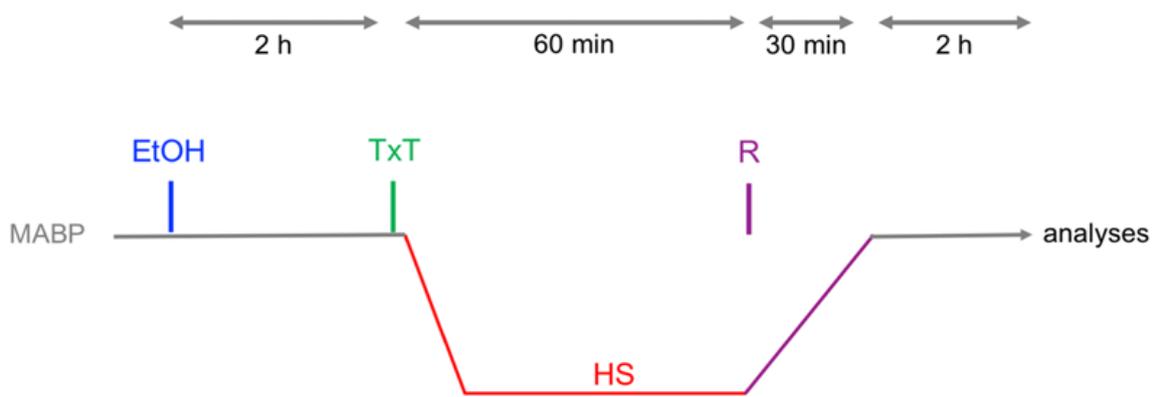
Es erfolgte eine kontinuierliche Messung und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur mit Hilfe einer rektalen Sonde und eines Heizkissens bei 37° Celsius.

Nach 60 Minuten erfolgte die manuelle Reperfusion mit 60% des entnommenen Blutes plus 50% des maximal entnommenen Blutvolumens als Ringer-Laktat-Lösung über die linke *vena jugularis*. Die Reperfusion erfolgte über 10 Minuten, gefolgt von einer 20-minütigen Stabilisierungsphase.<sup>103,104</sup> Nach Abschluss der Stabilisierungsphase wurden die Katheter entfernt, sowie Gefäße und Wunden mittels Naht verschlossen. Die Isofluran-Anästhesie wurde beendet. Nach weiteren 2 Stunden wurde das *Sacrifice* durchgeführt.

### ***Sacrifice***

Zwei Stunden nach Ende der Reperfusion wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert und in Rückenlage auf der Arbeitsfläche fixiert. Die Bauchdecke wurde vom Becken bis zum *Thorax* eröffnet und die abominelle *vena cava* inszidiert. Die Tiere wurden mittels Blutentzug durch eine heparinisierte 10 ml Spritze und Setzen eines beidseitigen *Pneumothorax* getötet. Die *Trachea* wurde präpariert, ein peripherer Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle® 1,10 x 33 mm, G 20) eingeführt und eine

bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit 8 ml Kochsalzlösung durchgeführt. 6 ml BAL wurden entnommen und sofort auf Eis gelagert. Anschließend wurde der rechte Lungen-Mittellappen nach Umschlingen und Abklemmen des zuführenden Bronchus entfernt, von diesem fünf 3x3 mm große Stücke entnommen und direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lunge wurde nun über den peripheren Venenverweilkatheter mit 20%igem Formalin gespült, der linke Lungenflügel entfernt, aus diesem fünf 3x3 mm große Gewebeproben entnommen und in 20%-igem Formalin gelagert.



**Abbildung 1:** Graphische Darstellung des Versuchsablaufes. Zwei vor Thoraxtrauma (TxT) erhielten die Tiere entweder eine Gavage mit 30% Ethanol (EtOH) oder Kochsalz (NaCl). Der hämorrhagische Schock (HS) wurde im Anschluss induziert und über 60 Minuten kontrolliert bei  $35 \pm 3$  mm Hg aufrechterhalten. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die Reperfusion (R) mit 60% des entnommenen Blutes plus 50% des maximal entnommenen Blutvolumens als Ringer-Laktat-Lösung. Das Sacrifice erfolgte zwei Stunden nach Ende der Reperfusion.<sup>105</sup>

### Untersuchung des Lungengewebes

Wie beschrieben, wurde zwei Stunden nach Ende der Reperfusion die Lunge mit Kochsalzlösung gespült und 6 ml BAL zur weiteren Untersuchung entnommen. Die BAL wurde bei 2000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -80°C zur anschließenden Bestimmung des totalen Proteingehaltes gelagert.<sup>105,106</sup>

Der histologische Schaden des Lungengewebes wurde durch einen unabhängigen Pathologen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und verblindet ausgewertet. Als Maßeinheit des Gewebeschadens diente der *lung injury score*, welcher die intra-alveoläre Infiltration durch Erythrozyten und anderen Zellen, sowie die Fibrinbelegung und das interstitielle Ödem in den Alveolen misst.<sup>107,108</sup>

## **Quantifizierung der polymorphkernigen Leukozyten im Lungenparenchym**

Zur Analyse der Infiltration des Lungengewebes mit polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) wurden Gewebeschnitte mit Chloracetat-Esterase-Färbung (CAE, 4% Pararosanilin, 4% Natriumnitrit und Naphthollösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur, RT) wie zuvor beschrieben hergestellt.<sup>103,105,109</sup> Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Zur Bestimmung der PMNL-Infiltration wurden CAE-positive Zellen in 20 Feldern pro Schnitt pro Tier bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet.

## **Isolation der Ribonukleinsäuren (RNA) und *semi-quantitative reverse-transcription-polymerase chain reaction* (qRT-PCR)**

Für die Isolation der RNA wurde das schockgefrorene Lungengewebe verwendet und nach Herstellerangaben verarbeitet (RNeasy-System, Qiagen, Hilden, Deutschland). Ebenfalls nach Herstellerangaben erfolgte die Entfernung von DNA durch Verwendung des *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Qualität und Menge der isolierten RNA wurden photometrisch unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) bestimmt. 100 ng der Lungen-RNA wurden nach Herstellerangaben unter Benutzung des *Affinity script* QPCR-cDNA Synthese Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) reversibel transkribiert. Die Interleukin-6 Gen Expression wurde durch Verwendung des Stratagene MX3005p QPCR Systems (Stratagene) und eines genspezifischen Primers für Ratten-Interleukin 6 (NM\_012589.2, UniGene#: Rn.9873, Cat#: PPR06483B, SABiosciences, SuperArray, Frederick, MD, USA) bestimmt. Als Gen-Expression zur Referenz wurde die mRNA-Expression von GADPH (rat *Gapdh*, NM\_017008, UniGene#: Rn.91450, Cat#: PPR06557A, SABiosciences) verwendet. Die Erstellung der PCR-Reaktion fand mit 1x RT2 SYBR Green/Rox qPCR Master mix (SABiosciences) in einem Volumen von 25 µl statt. Es wurde ein zweischrittiges Amplifikationsprogramm ausgewählt, welches aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten bestand, gefolgt von 40 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95°C und abgeschlossen durch Vervielfältigung für 60 Sekunden bei 60°C. Die relative Expression des Zielgens wurde durch die vergleichende threshold-cycle (CT) Methode ( $2^{\Delta\Delta CT}$  Methode) berechnet. Die relative mRNA Expression von Interleukin 6 ist in % in Relation zu 100% der *sham* Gruppe dargestellt.

## **Messung der Oberflächenrezeptorexpression in der Durchflusszytometrie**

Die Blutproben wurden 2 Stunden nach Ende der Reperfusion in pyrogen-freien, heparinisierten Röhrchen gesammelt. 50 µl wurden in Polystyrol-FACS Röhrchen (BD Pharmingen™) transferiert und mit FITC *mouse anti-rat* CD11b (Clone WT.5, BD Bioscience, San Jose, CA), *anti-rat* CD31 (PECAM-1) PE-Cyanine7 (Clone TLD-3A12, eBioscience, San Diego, CA), and APC *mouse anti-rat* CD62L (Clone OX-85, BioLegend, San Diego, CA) Antikörpern inkubiert. Es wurden Kontroll-Färbungen mit den zugehörigen Isotyp-Antikörpern angefertigt. Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde 1 ml FACS Lysing Solution (BD Pharmingen™) hinzugefügt und weitere 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 7 Minuten bei 400 g zentrifugiert und zweimal mit 2 ml FACS Puffer (bestehend aus Phosphatgepufferter Salzlösung und 0,5% Rinderalbumin), gewaschen. Die Überstände wurden entfernt, die Zellen in 400 µl FACS Buffer verdünnt und im Anschluss gemessen. Jede Zellpopulation wurde in dem korrespondierenden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. Je Probe wurden mindestens 30.000 Zellen ausgewertet und der *mean fluorescence units* (MFU) mittels durchflusszytometrischer Messung an einem BD FACS Canto 2™ mit der FACD DIVA™ Software (BD) bestimmt.<sup>105,106,110</sup>

### **Assay zur Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-3**

Die aktiven Caspasen wurden durch Verwendung des FAM-YVAD-FMK 660 *Caspase-1 detection kit* und „FAM-DEVD-FLICA *Caspase-3/7 kit* (ImmunoChemistry Technologies) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt.<sup>105</sup> Die MFU der gefärbten Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Messung an einem BD FACS Canto 2™ mit der FACD DIVA™ Software (BD) bestimmt.<sup>105,106,110</sup>

### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA). Die Angabe der Daten erfolgte dabei als Mittelwert ± Standardfehler. Die Normalverteilung wurde durch den Kolmogorow-Smirnov Test mit Dallal-Wilkinson-Lillefor p-Wert bestimmt. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p Wert unter 0,05 angegeben.

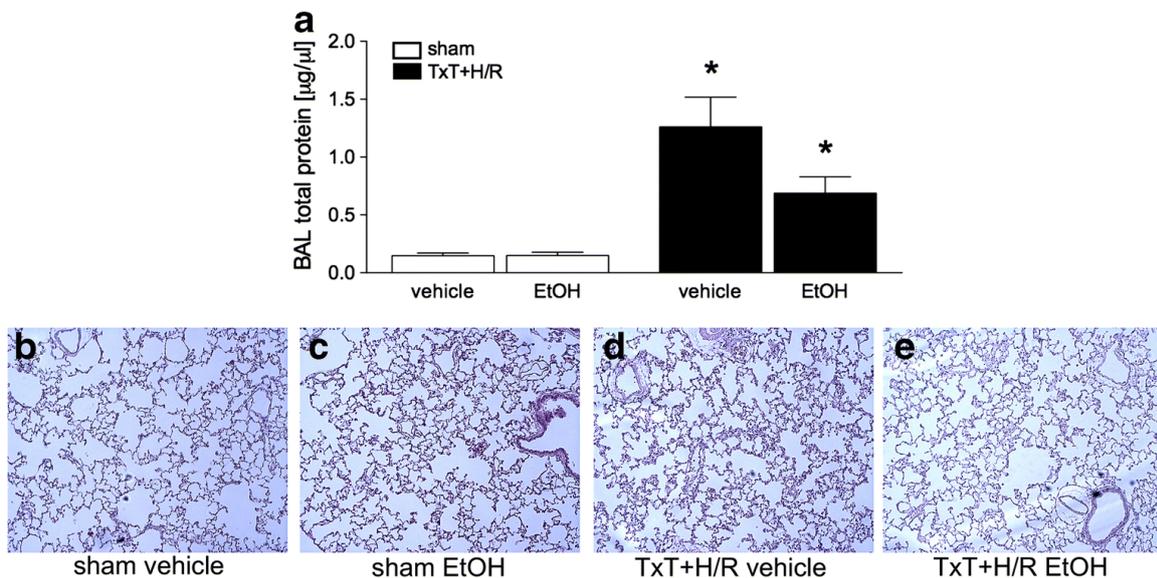
### 3.1.2 Ergebnisse

#### Gesamtproteingehalt in der bronchoalveolären Lavage

Zwei Stunden nach Ende der Reperfusion zeigte sich in der BAL nach TxT+H/R ein signifikanter Anstieg des Gesamtproteingehaltes auf  $1.26 \pm 0.26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  im Vergleich zu kontrolloperierten *sham* Tieren ( $0.14 \pm 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $p < 0.05$ , Abb. 2A). Zum selben Zeitpunkt zeigten die Tiere der TxT+H/R EtOH Gruppe eine signifikante Abnahme des Proteingehaltes im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe ( $p < 0.05$ , Abb. 2A). Der Proteingehalt der Tiere der TxT+H/R EtOH Gruppe lag immer noch signifikant über dem der *sham vehicle* und *sham* EtOH Gruppen ( $p < 0.05$ , Abb. 2A).

#### Histologische Auswertung des Lungengewebes

Die Lungenschnitte der *sham vehicle* Gruppe und der *sham* EtOH Gruppe zeigten keine signifikanten Veränderungen. (Abb. 2b und 2e). Die Lungenschnitte der TxT+H/R *vehicle* Gruppe zeigten alveoläre Einrisse mit Wandverdickungen und zellulären Infiltraten im Vergleich zur Lungenmorphologie der *Sham*-Gruppen (Abb. 2b-d). Die durch TxT+H/R induzierten Veränderungen der Lungenmorphologie waren in der TxT+H/R EtOH Gruppe nicht signifikant verändert (Abb. 2e).



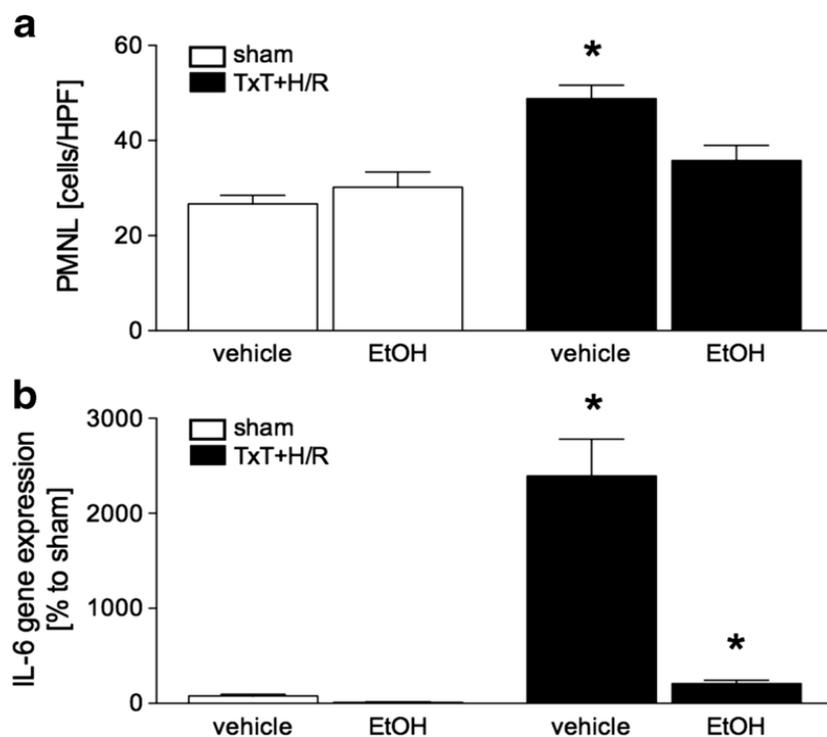
**Abbildung 2:** Aus der entnommenen BAL wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt (a). Bilder (b) bis (e): Repräsentative histologische Darstellungen des Lungenschadens zwei Stunden nach *sham* Operation mit vorheriger NaCl (*vehicle*)-Gavage (b) oder Ethanol (EtOH)-Gavage (c) sowie TxT+H/R mit vorheriger NaCl (*vehicle*)-Gavage (d) oder Ethanol (EtOH)-Gavage (e). Datenangabe als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* $p < 0,05$  vs. alle,  $n=6$ .<sup>105</sup>

### Infiltration der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in die Lunge

Zwei Stunden nach Ende der Reperfusion war ein signifikanter Anstieg der PMN im Lungengewebe in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe im Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe zu sehen ( $48.82 \pm 2.82$  vs.  $26.68 \pm 1.80$  Zellen pro Gesichtsfeld,  $p < 0.05$ , Abb. 3a). Vorherige Gavage mit EtOH senkte signifikant die PMN Infiltration in das Lungengewebe nach TxT+H/R im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe ( $35.79 \pm 3.18$  vs.  $48.82 \pm 2.82$  Zellen pro Gesichtsfeld,  $p < 0.05$ , 65 Abb. 3a).

### Interleukin-6 Genexpression im Lungengewebe

Die IL-6 Genexpression in der Lunge stieg zwei Stunden nach Ende der Reperfusion signifikant in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe im Vergleich zur *sham NaCl* Gruppe ( $2393.00 \pm 389.50$  vs.  $78.17 \pm 18.39$ ,  $p < 0.05$ , Abb. 3b). Im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe wurde die IL-6 Genexpression durch EtOH nach TxT+H/R signifikant vermindert ( $p < 0.05$ , Abb. 3b).



**Abbildung 3:** Zur Bestimmung der PMNL-Infiltration wurden Gewebeschnitte mit Chloracetat-Esterase-Färbung (CAE) hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. CAE-positive Zellen wurden in 20 Feldern pro Schnitt pro Tier bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. (a). Für die Bestimmung der IL-6 Gen-Expression

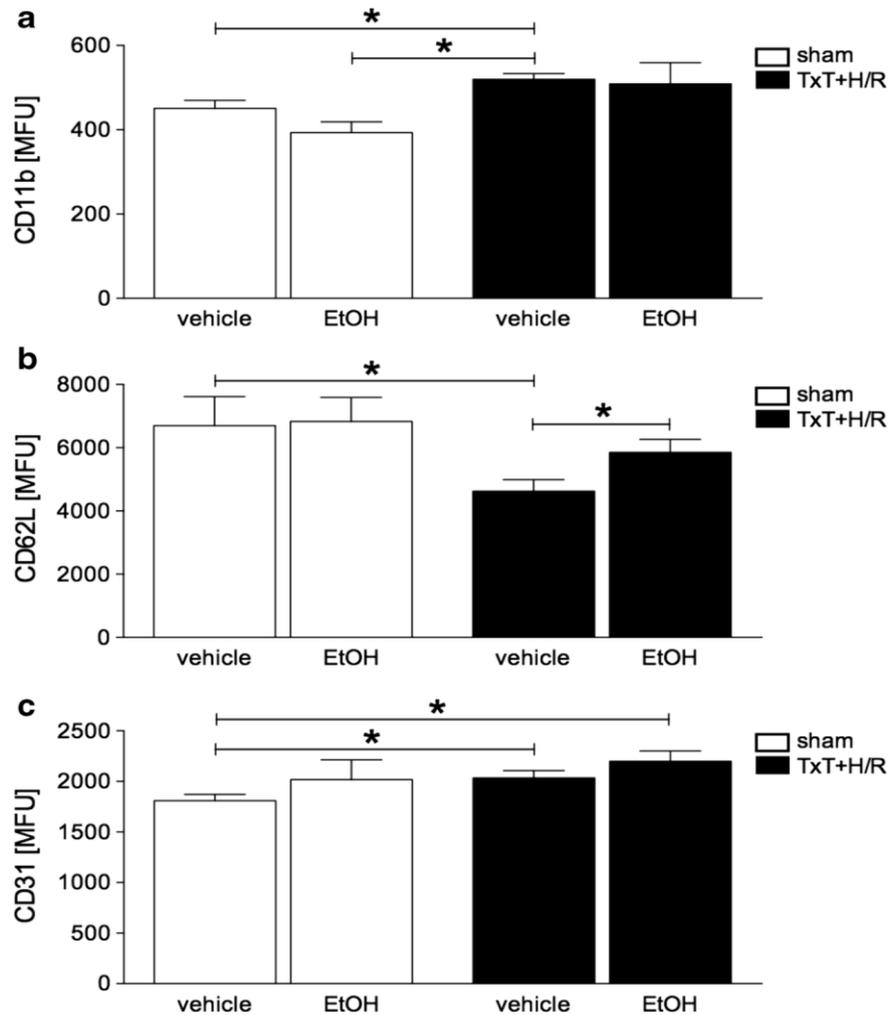
wurde RNA aus schockgefrorenem Lungengewebe isoliert und mittels qRT-PCR ausgewertet. Die Gewebeentnahmen erfolgten zwei Stunden nach Ende der Reperfusion bzw. der chirurgischen Prozeduren. Sham Tiere unterliefen den chirurgischen Prozeduren. *Vehicle*-behandelte Tiere erhielten Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) zur Kontrolle, mit Ethanol- (EtOH, Alkohol) behandelte Tiere (5 g/kg Körpergewicht, 30% EtOH). Datenangabe als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* $p < 0,05$  vs. alle,  $n=6$ .<sup>105</sup>

### **Expression der Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten**

Nach TxT+H/R zeigte sich in der *vehicle* Gruppe ein signifikanter Anstieg der Expression des Oberflächenrezeptors CD11b auf zirkulierenden Granulozyten sowohl im Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe als auch zur *sham EtOH* Gruppe ( $p < 0.05$ , Abb. 4a). Auch in der TxT+H/R EtOH Gruppe zeigte sich eine erhöhte CD11b Expression im Vergleich zu den TxT+H/R EtOH und TxT+H/R *vehicle* Gruppen, diese war allerdings nicht signifikant. Desweiteren zeigt sich ein Trend zur Abnahme der Expression von CD11b in der *sham EtOH* Gruppe im Vergleich zur *Sham vehicle* Gruppe, auch dieser war nicht signifikant.

Bei der Expression des Oberflächenrezeptors CD62L konnten wir einen signifikanten Abfall in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe im Vergleich zu den *sham vehicle* und *Sham EtOH* Gruppen feststellen ( $p < 0.05$ , Abb. 4b). Im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe erhöht vorherige EtOH-Gabe in der TxT+H/R EtOH Gruppe die Expression von CD62L signifikant ( $p < 0.05$ , Abb. 4b).

TxT+H/R induzierte einen signifikanten Anstieg der Expression des Oberflächenrezeptors CD31b sowohl in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe als auch in der TxT+H/R EtOH Gruppe im Vergleich zur *sham NaCl* Gruppe ( $p < 0.05$ , Abb. 4c). Die vorherige EtOH Gavage führte sowohl in der *sham EtOH* Gruppe im Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe als auch in der TxT+H/R EtOH im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe zu einem Anstieg der CD31b Expression, beide waren aber nicht signifikant (Abb. 4c).



**Abbildung 4:** Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenrezeptoren CD11B (a), CD62L (b) und CD31 (c) auf zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Die Blutentnahmen erfolgten zwei Stunden nach Ende der Reperfusion bzw. der chirurgischen Prozeduren. Sham Tiere unterliefen den chirurgischen Prozeduren. *Vehicle*-behandelte Tiere erhielten Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) zur Kontrolle, mit Ethanol- (EtOH, Alkohol) behandelte Tiere (5 g/kg Körpergewicht, 30% EtOH). Datenangabe als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* $p < 0,05$  vs. markierte Gruppen=6.<sup>105</sup>

### Apoptotische und pyroptotische Aktivität in Granulozyten und Monozyten

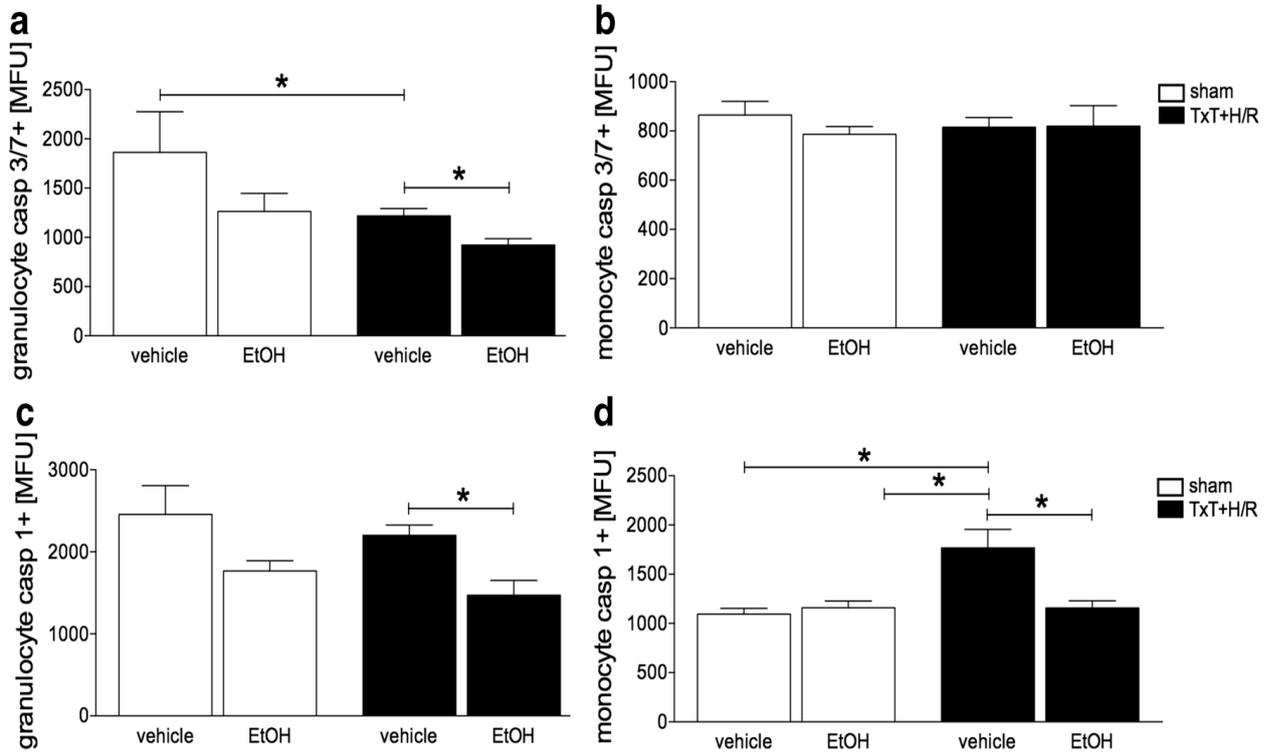
Die Aktivität der Caspasen-3/7 zeigte sich nach TxT+H/R in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe signifikant verringert im Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe. Vorherige EtOH Gavage verstärkte diesen Effekt und senkte diese signifikant in der TxT+H/R EtOH im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe ( $p < 0.05$ , Abb. 5a). Wir konnten einen klaren Trend zur Verminderung der Caspase-3/7 Aktivität in der *sham* EtOH Gruppe im

Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe feststellen, allerdings war dieser nicht signifikant (Abb. 5a).

Bezüglich der Aktivität der Caspase-3/7 in Monozyten konnten wir keine signifikanten Veränderungen feststellen.

In Granulozyten konnten wir hinsichtlich der Caspase-1 einen Trend zur Verminderung der Aktivität nach EtOH Applikation in der *sham EtOH* im Vergleich zur *sham vehicle* Gruppe nachweisen, dieser war allerdings nicht signifikant. Vergleichbare Daten zeigten sich in der TxT+H/R EtOH Gruppe im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe, hier senkte die Applikation von EtOH die Aktivität der Caspase-1 signifikant ( $p < 0.05$ , Abb. 5c).

In Monozyten konnten wir hinsichtlich der Aktivität von Caspase-1 keinen Unterschied zwischen den *Sham EtOH* und *Sham vehicle* Gruppen feststellen. Nach TxT+H/R hingegen kommt es zum signifikanten Anstieg in der TxT+H/R *vehicle* Gruppe im Vergleich zu beiden *Sham* Gruppen ( $p < 0.05$ , Abb. 5d). Vorherige Behandlung mit EtOH senkt die Aktivität von Caspase-1 nach TxT+H/R in der TxT+H/R EtOH Gruppe im Vergleich zur TxT+H/R *vehicle* Gruppe signifikant auf das Niveau der beiden *sham* Gruppen ( $p < 0.05$ , Abb. 5d).



**Abbildung 5:** Durchflusszytometrische Messung der Aktivität von Caspase-3/7 und Caspase-1 in zirkulierenden Granulozyten (a) und (c) und in zirkulierenden Monozyten (b) und (d). Die Blutentnahmen erfolgten zwei Stunden nach Ende der Reperfusion bzw. der chirurgischen Prozeduren. *Sham* Tiere unterliefen den chirurgischen Prozeduren. *Vehicle*-behandelte Tiere erhielten Kochsalzlösung (NaCL 0,9%) zur Kontrolle, mit Ethanol- (EtOH, Alkohol) behandelte Tiere (5 g/kg Körpergewicht, 30% EtOH). Datenangabe als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* $p < 0,05$  vs. markierte Gruppe,  $n=6$ .<sup>105</sup>

### 3.2 Diskussion der Gesamtergebnisse und deren Beitrag zur Beantwortung der Fragestellung

Trotz enormer Fortschritte in der Versorgung schwerverletzter Patienten ist das Organ- und Multiorganversagen im klinischen Folgeverlauf immer noch eine große Herausforderung. Fröhlich *et al.* konnten eine Zunahme der Inzidenz von MOV um 7% im Zeitraum von 2002 bis 2011 zeigen.<sup>8</sup> Vor allem relevante Thoraxtraumata und das Erleiden eines hämorrhagischen Schocks prädestinieren für eine überschießende Immunantwort, welche durch eine starke Inflammation gekennzeichnet ist und im MOV und Tod enden kann.<sup>8,9</sup> Während chronischer Alkoholkonsum inflammatorische Zustände begünstigt und bedingt,<sup>111-113</sup> führt akuter Alkoholkonsum zu einer Suppression der inflammatorischen Immunantwort nach Trauma und konnte in einem Tiermodell sogar die Mortalität nach HS signifikant verringern.<sup>34,88,89</sup> Die verringerte Sterblichkeit in der erwähnten, eigenen Studie war mit einer immunsuppressiven Einflussnahme der akuten Alkoholintoxikation nach Trauma assoziiert. Da der hämorrhagische Schock meist als Komplikation einer Grundverletzung und selten isoliert einem traumatischen Geschehen auftritt,<sup>6,114</sup> sollte in weiterführenden Studien ein Kombinationsmodell bestehend aus einem Thoraxtrauma mit hämorrhagischen Schock etabliert werden, um die Wirkung einer akuten Alkoholintoxikation im Sinne der verbesserten klinischen Translationalität zu untersuchen. Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein solches *in vivo* Modell etabliert, welches einem klinischen *Drink and Drive* Szenario ähnelt und so die Bedingungen simuliert, die ein Patient nach Alkoholabusus mit folgendem TxT und hämorrhagischen Schock erleidet. Aufgrund der hohen Prävalenz von traumatischen Thoraxverletzungen und hämorrhagischem Schock unter Traumapatienten als auch deren hohem Anteil an der Sterblichkeit und Verbindung zum MOV im klinischen Folgeverlauf ist die klinische Relevanz dieses Modells unbestreitbar.<sup>6,102,115</sup> Zudem sind die Daten bezüglich des Einflusses von Alkohol auf die Gesundheitsfolgen von Traumapatienten sehr inhomogen<sup>25,28,30,116</sup> und unterstreichen die Notwendigkeit eines reproduzierbaren Tiermodells zum Erreichen eines besseren Verständnisses der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Die Anforderungen an ein geeignetes Tiermodell sind hoch und stetig neu zu diskutieren. Bereits 1998 formulierte Edwin Deich in einem vielbeachteten *review*-Artikel das Problem, dass viele präklinisch sehr erfolgreiche Reagenzien und Therapieansätze in der klinischen Anwendung nicht die erhoffte Wirkung zeigten.<sup>117</sup> Er

analysierte die vorhandenen Tiermodelle und stellte fest, dass wenige die klinische Realität simulierten. 2003 publizierte Jeannine Majde die Ergebnisse eines Seminars aus dem Jahr 2000, an welchem sich die führenden Forscher im Bereich des Hämorrhagischen Schocks beteiligten, um sich über ihre benutzten Protokolle auszutauschen, beeinflussende Variablen zu identifizieren und gemeinsame Endpunkte zu definieren.<sup>118</sup> Maide zeigte weitere wichtige Variablen von Schockmodellen auf, die aufgrund ihres hohen Einflusses auf die Ergebnisse in künftigen Schockmodellen standardisiert oder zumindest entsprechend gekennzeichnet und artikuliert werden sollten. Diese seien unter anderem der physiologische Zustand der Tiere, die genauen Abläufe der experimentellen Vorgehensweisen, das Protokoll zur Flüssigkeitstherapie nach Hämorrhagie als auch die gemessenen Endpunkte und die Gesundheitsfolgen für die Tiere. Sie beschreibt, dass viele Modelle sich an dem wissenschaftlichen Ziel des jeweiligen Forschers orientierten und die klinische Realität zu wenig Beachtung fände. Desweiteren wird kritisiert, dass die vorhandenen Modelle aufgrund unterschiedlicher Studienprotokolle wenig reproduzierbar und vergleichbar seien. Sie fordert, künftige Tiermodelle zu standardisieren, oder bestehende Abweichungen zu artikulieren und zu diskutieren.<sup>118</sup> In diesem Sinne entwickelten wir unser Versuchsprotokoll auf der Basis von Modellen, welche bereits in unserer Versuchsgruppe etabliert oder in ähnlichem Kontext erfolgversprechende Ansätze gezeigt hatten.<sup>89,90,119,120</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Tiere des *LEWIS*-Stammes verwendet. Für diesen Stamm gab es zum Einen ein in unserer Forschungsgruppe bereits gut etabliertes Modell des HS,<sup>90,121</sup> zum Anderen lagen bereits repräsentative, reproduzierbare Daten über den Einfluss von Alkohol auf die lokale und systemische Inflammation im genannten Stamm vor. Wie in erwähnten vorausgegangenen Studien verwendeten wir ein druckgesteuertes Schockmodell und entschieden uns somit gegen ein volumen- bzw unkontrolliertes Modell. Tsukamoto und Pape publizierten 2009 einen *review* Artikel über diverse Tiermodelle zu Trauma und HS, in welchem sie sich mit den Vorteilen und Nachteilen von verschiedenen Tierspezies, den Unterschieden zwischen druck-, volumengesteuerten als auch unkontrollierten Schockmodellen und den bestehenden Kombinationsmodellen befassten.<sup>122</sup> Sie bestätigten, dass ein druckgesteuertes Modell am Besten geeignet sei, um physiologische Mechanismen und Organverletzungen am zu untersuchen, da die Forscher,innen so den größten Einfluss auf die Tiefe und Dauer des Schocks hätten.<sup>122</sup> Obwohl man dieses Modell aufgrund der fehlenden Wiedergabe der klinischen Realität kritisieren kann, stellte es aufgrund der Reproduzier- und Vergleichbarkeit das geeignete Modell für

unsere Anforderungen dar. Auch bezüglich des Thoraxtraumas fand ein bereits gut an Kleintieren etabliertes Modell Anwendung.<sup>119,120</sup> Wie durch Knöferl *et al.* beschrieben, eignet sich verwendetes Modell durch mehrere Faktoren zur experimentellen Forschung des Thoraxtrauma im Tiermodell.<sup>123</sup> Aufgrund der verwendeten Kleintiere und der standardisierten Druckwelle ist das Modell gut reproduzierbar, die Kosten bleiben bei relativ hoher Probenmenge gering.<sup>123</sup> Es erlaubt die isolierte Betrachtung der Traumafolgen an der Lunge ohne Beeinflussung durch Störfaktoren wie Intubation oder assistierter Beatmung bei der Auswertung von Daten polytraumatisierter Patienten. Zudem konnte durch makros- und mikroskopische Auswertungen gezeigt werden, dass durch verwendete Druckwelle isolierte Kontusionen der Lungen erzeugt werden, welche sich durch intraalveoläre, intrabronchiale und subpleurale Einblutungen als auch durch Atelektasen und interstitielle Ödeme manifestieren, jedoch ohne Begleitverletzungen intraabdomineller Organe geschehen.<sup>123</sup> Auch in unseren histologischen Auswertungen bestätigte sich die Induktion bipulmonaler Lungenkontusionen, abdominalen Verletzungen wurde zudem durch eine Plexiglashülle vorgebeugt. Auch der Abfall des Blutdruck- und Hämoglobinwertes direkt nach Trauma sprechen für die Relevanz der erzeugten Traumas, wobei hier auch die chirurgischen Prozeduren an sich und vagale Reflexe zu berücksichtigen sind.<sup>100,123,124</sup> Zudem konnte durch unsere Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass die Alkoholintoxikation an sich Einfluss nimmt auf das kardiovaskuläre System. So zeigten alkoholisierte Tiere während des gesamten Versuchsablaufes einen erniedrigten mittleren arteriellen Blutdruck, desweiteren wurden geringere *bleed-out* Volumina zum Erreichen und Erhalten der angestrebten Hypotension benötigt.<sup>100</sup> Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in Modellen des isolierten HS von Phelan *et al.* und Molina *et al.* gezeigt werden,<sup>125,126</sup> letzterer konnte auch einen hemmenden Einfluss der Alkoholintoxikation auf das adrenerge System und somit Rekompensationsmechanismen nach Erleiden eines HS demonstrieren.<sup>126</sup> Auch in der retrospektiven Auswertung alkoholintoxizierter Traumapatienten fiel ein niedrigerer systolischer Blutdruck bei akut intoxizierten im Vergleich zu nicht intoxizierten Patienten als auch eine erhöhte Anzahl an benötigten Blut- und Flüssigkeitsprodukten bei substitutionspflichtiger Hypotension auf.<sup>127</sup> Zusammengefasst konnten wir ein Kombinationsmodell aus Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock entwickeln, welches unseres Wissens nach neuartig ist und die klinische Realität suffizient widerspiegelt. Nach erfolgreicher Modelletablierung untersuchten wir in einem klinisch relevanten Kombinationsmodell aus TxT und HS den Einfluss von Alkohol auf die frühe

Immunantwort nach Trauma, mit besonderem Augenmerk auf die pulmonalen Komplikationen und die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei deren Entstehung untersuchen. Wir fanden heraus, dass TxT und HS zu histopathologischen Veränderungen in der Lunge führt, welche mit einem erhöhten Proteingehalt in der BAL, erhöhter lokaler Inflammation und Invasion von PMNL in das Lungengewebe assoziiert war. Erhielten die Tiere 30%iges Ethanol als orale Gavage zwei Stunden vor Versuchsbeginn, konnten wir feststellen, dass sowohl die lokale Inflammation, die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten als auch der Proteingehalt in der BAL signifikant erniedrigt war, die histopathologischen Schäden am Lungengewebe blieben hingegen unverändert. TxT und HS aktivierten zirkulierende neutrophile Granulozyten durch eine Erhöhung der CD11b-, CD31- und Erniedrigung der CD62L-Expression auf deren Oberfläche und verminderte die Apoptoserate. In zirkulierenden Monozyten konnten wir nach TxT und HS eine stark erhöhte Inflammasomaktivität durch Messung der aktiven Caspase-1 feststellen. Alkohol-Gavage vor Versuchsbeginn führte zu einer erhöhten CD62L und CD31 Expression nach TxT und HS, und erniedrigte die Caspase-3/7 Aktivität in Granulozyten als auch die Caspase-1 Aktivität in Monozyten und Granulozyten. Wir konnten so wichtige Beiträge zum Verständnis der immunsuppressiven Rolle einer akuten Alkoholintoxikation bei der Entstehung von pulmonalen Veränderungen und im vorliegenden Modell leisten.

Vergleichbar zu den Beobachtungen von kleineren und größeren *in vivo* Modellen, welche sich mit TxT und HS beschäftigten, fanden wir heraus, dass TxT und HS einen schweren Schaden im Lungengewebe verursachte, der mit verstärkter lokaler und systemischer Inflammation in Zusammenhang steht. TxT an sich führte bereits in Tiermodellen an Schweinen, Ratten und Mäusen zu mechanischem Zellschaden und Einblutungen in das Lungengewebe.<sup>36,128,129</sup> Diese Beobachtungen konnte unser Modell bestätigen, die histologischen Schäden zeigten sich vor Allem durch Lungenödeme, Wandverdickungen und diffuse Alveolarschäden.<sup>128,123</sup> Unsere Ergebnisse zeigten, dass TxT und HS eine lokale histopathologische Veränderung des Lungengewebes induzierte, welche durch ein erhöhtes pulmonales Leck, gemessen durch den erhöhten Proteingehalt in der BAL nach TxT und HS bestätigt wurden. Zudem haben die oben genannten Studien einen signifikanten lokalen Anstieg von IL-6 und IL-8 gezeigt, wobei sich Ersterer auch in unserem Modell durch Messung der Genexpression bestätigt hat.<sup>60,123</sup> Die entzündlichen Veränderungen im Lungengewebe sind ein wichtiger Bestandteil der

pathophysiologischen Veränderungen nach Trauma. Ein Anstieg der pro-inflammatorischen Mediatoren nach TxT und HS steht in direktem Zusammenhang mit der Infiltration von neutrophilen Granulozyten nach Trauma und deren Schädigung des Gewebes.<sup>89,108</sup> Bereits in den 1990er Jahren konnten Donnelly *et al.* zeigen, dass sich in der BAL von ARDS-Patienten erhöhte IL-8 Werte und vermehrt neutrophile Granulozyten finden, welche mit der Schwere des ARDS korrelierten.<sup>13,64</sup> *In vitro* Experimente bestätigten den chemotaktischen Effekt von IL-8 auf PMNL und den IL-6 induzierten Anstieg von PMNL Adhäsion bei menschlichen Lungenepithelzellen.<sup>63,92</sup> Interessanterweise führte die Behandlung dieser Zellen mit Alkohol zu einer verminderten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine durch die Epithelzellen und die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an diese.<sup>92</sup> Diese Hinweise konnten durch *in vivo* Experimente bestätigt werden, welche zeigten, dass sowohl HS-induzierter systemischer und lokaler IL-6 Anstieg als auch die Gewebeinfiltration von neutrophilen Granulozyten durch akuten Alkoholeinfluss reduziert werden konnte.<sup>89</sup> Die Stimulation von Lungenepithelzellen mit sowohl IL-1 $\beta$  als auch mit Sera von Traumapatienten erzeugte sowohl eine starke Sezernierung von IL-6 als auch eine verstärkte Adhärenz von Neutrophilen an diese Zellen.<sup>94</sup> In Einklang mit den oben genannten Studien reduzierte akuter Alkoholeinfluss diesen Effekt.<sup>94</sup> Der mögliche Mechanismus hinter diesen Effekten ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.<sup>94</sup> In eigenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass eine akute Alkoholexposition die p50 Aktivierung, die den kanonischen Weg der NF- $\kappa$ B Aktivierung darstellt, signifikant reduziert.<sup>94</sup> Interessanterweise reduziert Alkohol nicht die Aktivierung der p52 Untereinheit, die den nicht kanonischen Weg darstellt.<sup>94</sup> Zusammengefasst sind die anti-inflammatorischen Effekte des Alkohols durch verminderte Spiegel von aktiven NF- $\kappa$ B p50 Untereinheiten im Zellkern vermittelt, und somit scheinbar durch den kanonischen Weg.<sup>94</sup> NF- $\kappa$ B induziert die lokale und systemische Inflammation.<sup>130,131</sup> Obwohl wir in dieser Studie die Wirkung von NF- $\kappa$ B nicht direkt gemessen haben, waren anti-inflammatorische Prozesse zu beobachten, die stark auf die Schlüsselfunktion von Alkohol durch Inhibierung von NF- $\kappa$ B hinweisen. Dieser offensichtlich inflammationshemmende Einfluss von akuter Alkoholexposition wurde durch unsere Studie bestätigt. Obwohl sich der genannte gewebeprotective Effekt von Alkohol nach TxT und HS nicht anhand der histologischen Auswertung darstellen ließ, weist doch der reduzierte Proteingehalt in der BAL auf ein deutlich reduziertes Kapillarleck und

Gewebeschaden hin. Zukünftige Studien zu den genauen Mechanismen der Inflammation mit Bezug auf den Gewebeschaden und die Organfunktion sind hier von Nöten.

Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Initiierung und Verstärkung der inflammatorischen Antwort nach Trauma.<sup>75</sup> Traumatische Verletzungen, Hämorrhagie und entzündliche Gewebezustände führen zu messbaren Veränderungen in deren Funktion, Lebensspanne und der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren und beeinflussen so deren Migrationsverhalten in entzündetes Gewebe. Vergleichbar mit unseren Daten wurde in verschiedenen Trauma-Szenarien wie stumpfem TxT, penetrierendem TxT oder nach Schädel-Hirn-Trauma (SHT) eine Reduktion der Expression von L-Selectin, welches die Bindung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel vermittelt, auf der Oberfläche von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten gezeigt.<sup>38,132,133</sup> Diese Beobachtungen wurden 6, 9 und 24 Stunden nach Trauma festgestellt.<sup>132,133</sup> Interessanterweise konnte für die kurze Zeitspanne von 2,5 Stunden nach Trauma ein kurzfristiger Anstieg des CD62L beobachtet werden.<sup>134,135</sup> Mommsen *et al.* konnten zeigen, dass es durch *in vitro* Stimulation von PNM mit TNF- $\alpha$ , nicht aber durch IL-1 $\beta$  und IL-6 zur proteolytischen Abstoßung von L-Selectin und einhergehend Minderung der Oberflächenexpression kommt.<sup>136</sup> Das zirkulierende *soluble* L-Selectin (s)L-Selectin konkurriert mit dem L-Selectin auf der Oberfläche der zirkulierenden Granulozyten um die Bindungsstellen am entzündeten Endothel und kann so zum Schutz vor übermäßiger Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe führen.<sup>137</sup> Ein früher Anstieg des L-Selectin nach Trauma kann so als migrations-erleichternder Faktor gewertet werden, die spätere Reduktion als Schutz vor Überinflammation. Buckley *et al.* konnten zeigen, dass bereits migrierte neutrophile Granulozyten aus dem Subendothel retransmigrieren können, welche dann stark verminderte CD62L Expressionen aufweisen und *via* Inhibition von T-Zellen immunsuppressiv wirken.<sup>138</sup> Diese Population kann zur verminderten Messung von CD62L in zirkulierenden PMNL beitragen.<sup>132</sup> In unserem Modell sahen wir zwei Stunden nach TxT und HS eine signifikante Reduzierung der CD62L-Expression auf der Oberfläche von PMN, welche im Gegensatz zum frühen Anstieg nach Trauma steht, allerdings durch den Zustand erhöhter lokaler und systemischer Inflammation nach Kombinationstrauma aus TxT und HS erklärt werden kann. Im Einklang mit dieser Annahme steht die Reduktion des L-Selectin *shedding* nach vorheriger EtOH Applikation, die zu einer verminderten Entzündungsreaktion führte. Es bleibt weiter zu untersuchen, wann genau CD62L *shedding* in Ratten nach TxT und HS

stattfindet, welche Rolle L-Selectin in seiner löslichen Form auf die PMN Migration ausübt und ob Alkohol diesen Effekt nur verlangsamt oder gar aufhebt.

Die Daten zur Änderung der CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten zeigen inhomogene Ergebnisse. So beschreiben verschiedene Autoren eine erniedrigte Expression,<sup>139,140</sup> oder keine signifikante Änderung nach Trauma,<sup>63</sup> nach SHT und Verbrennung hingegen konnte ein Anstieg der CD11b Expression nachgewiesen werden.<sup>133,141</sup> Neben der Interaktion mit ICAM-1 und Vermittlung der festen Bindung von Leukozyten an Endothel, spielt CD11b auch bei der Opsonierung und Phagozytose von bakteriellen Erregern durch PMN eine wichtige Rolle.<sup>96,142</sup> In zirkulierenden Granulozyten liegt ein Großteil der gesamten CD11b Menge intrazellulär in sekretorischen Vesikeln vor, welche nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen bzw. proinflammatorischen Zytokinen mit der Membran verschmelzen und so die Expression von CD11b auf der Oberfläche der Leukozyten steigern.<sup>143-145</sup> Botha *et al.* konnten zeigen, dass eine Abnahme der CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten nach Trauma und HS in direktem Zusammenhang mit einer verminderten Anzahl von zirkulierenden Granulozyten steht und erklärten die verminderte Expression so durch eine vermehrte Sequestration von CD11b stark exprimierenden PMNL in Endgewebe und einem erhöhten Anteil junger, CD11b schwach exprimierender PMNL an den Messergebnissen.<sup>146</sup> Diese Theorie fand in jüngerer Vergangenheit durch Messung des CD16-Rezeptors bei Sepsis- und Traumapatienten Unterstützung.<sup>38,147</sup> Hazeldine *et al.* und Hietbrink *et al.* vermuteten eine traumabedingte „Lähmung“ von neutrophilen Granulozyten nach Trauma, da diese nach Stimulation mit fMLP eine verminderte Heraufregulierung von CD11b im Vergleich zu Granulozyten von gesunden Probanden zeigten, wobei letzterer ebenfalls die Verbindung zur erhöhten Anzahl junger und vermehrter Sequestration aktivierter, reifer Granulozyten herstellte.<sup>75,148</sup> Unsere Daten zeigen einen signifikanten Anstieg der CD11b Konzentration auf zirkulierenden neutrophilen Granulozyten zwei Stunden nach TxT und HS im Vergleich zu *sham* operierten Tieren. Dieser Anstieg steht im Einklang mit der erhöhten systemischen Inflammation und der entsprechenden Regulierung. Zudem haben auch hypoxische Zustände *in vitro* einen CD11b erhöhenden Einfluss auf PMNL gezeigt.<sup>139</sup> Botha *et al.* konnten desweiteren eine direkte Korrelation von *Base Excess* als Ausmaß der Hypoxie in Traumapatienten und Expression von CD11b feststellen.<sup>146</sup> Nach Alkoholgabe sahen wir sowohl in der *sham* als auch in der TxT+H/R Gruppe einen Trend zu reduzierter

CD11b Expression, der allerdings in beiden Fällen nicht signifikant war. Patel *et al.* beschrieben eine verminderte fMLP-provozierte Heraufregulierung von CD11b nach Inkubation von menschlichen PMNL in klinisch relevanten Dosen, Ergebnisse, die von Boé *et al.* im Mausmodell nach intratrachealer Installation von *S.pneumoniae* bestätigt werden konnten.<sup>95,96</sup> Auch bei der Expression von CD31, welches die parazelluläre TEM von Leukozyten durch homophile Interaktion von endothelständigen und leukozytengebundenen CD31 Molekülen moderiert, konnten wir einen Anstieg nach TxT und HS feststellen, der durch Ethanol noch verstärkt wurde. Die Mechanismen der Regulierung von CD31 auf Leukozyten und sein Einfluss auf deren Migration sind noch nicht komplett verstanden.<sup>73</sup> Während sich *in vitro* eine Reduktion der Migration von Leukozyten durch CD31 Blocker um 80% zeigte,<sup>149</sup> zeigten sich in CD31-defizienten Mäusen keine Unterschiede in der Migration von PMNL nach inflammatorischen Reizen.<sup>150</sup> Aktuelle Theorien gehen von einer Kompensierung der erniedrigten parazellulären TEM durch eine erhöhte transzelluläre TEM aus.<sup>73</sup> Insgesamt sehen wir eine erhöhte Expression von migrationsfördernden Oberflächenmolekülen auf zirkulierenden Granulozyten nach TxT und HS, welche im Einklang mit der erhöhten PMNL-Infiltration und dem erhöhten Kapillarleck durch höheren Proteingehalt in der BAL stehen. Entsprechend unserer Hypothese konnten diese Effekte durch vorherige Ethanolgabe reduziert und die PMN Migration als auch die Beschädigung der Barrierefunktion der Lunge reduziert werden. Zusammengenommen wirkt sich die akute Alkoholintoxikation positiv auf den posttraumatischen Gewebeschaden aus, indem es die systemische pro-inflammatorische Immunantwort hemmt, was möglicherweise zu erniedrigter Aktivierung zirkulierender Monozyten und Granulozyten und konsekutiv zu deren erniedrigter Migration in entzündetes Gewebe führt.

Obwohl neuere Forschungsergebnisse nahelegen, dass die Lebensspanne von neutrophilen Granulozyten lange Zeit unterschätzt wurde, ist es immer noch wissenschaftlicher Konsens, dass sie ihre Lebensdauer und Funktionalität deutlich verlängern können, falls benötigt.<sup>77,151</sup> Die Regelung der Apoptose von Granulozyten stellt sich als zweischneidiges Schwert heraus, da eine Verkürzung ihrer Lebensdauer und Funktionalität mit einer verminderten Erregerbeseitigung und vermehrter Entwicklungen von beispielsweise Pneumonien in Zusammenhang steht, zu langes Verweilen am Ort der Entzündung hingegen, wie bereits beschrieben, zu Schädigung und Untergang nicht bedrohten Gewebes führen kann.<sup>152,153</sup> Die Apoptose in neutrophilen Granulozyten wird

durch ein komplexes Zusammenspiel aus internen und externen Faktoren und Erhaltung einer Homöostase aus pro- und antiapoptotischen Proteinen reguliert. Durch externe Stimuli wie Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie durch TNF- $\alpha$  oder FasLigand (FasL) bzw. interne Stimuli wie mitochondriale Schädigung und Freisetzung von Cytochrom C führen von Aktivierung von Caspase-8 respektive Caspase-9, welche letztlich die sogenannten Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren.<sup>154-156</sup> Diese sind schlussendlich für die Ausführung der Apoptose und den Abbau der Zelle verantwortlich.<sup>156,157</sup> Verschiedene Studien zeigten eine drastische Reduzierung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten durch Trauma und HS als auch bei der Entwicklung von ARDS und Sepsis.<sup>80,85,133,158</sup> In septischen Patienten konnten Paunel-Görgülü *et al.* eine inverse Korrelation zwischen der Apoptose Rate von neutrophilen Granulozyten und dem Ausmaß des Organschadens feststellen.<sup>153</sup> Konkordant zu diesen Daten sahen wir eine signifikante Reduktion der Apoptose in zirkulierenden neutrophilen Granulozyten nach TxT und HS, gemessen an der Aktivität der Caspasen-3 und -7, wohingegen in zirkulierenden Monozyten kein Unterschied festzustellen war. Interessanterweise zeigte sich nach vorheriger Alkoholgabe eine weitere Reduktion der Apoptose in den Granulozyten, diese war auch in *sham* operierten Tieren ohne Trauma zu beobachten. Jüngste Forschungsarbeiten deckten weitere Mechanismen zur Senkung der Apoptose in Granulozyten nach Trauma bzw. Krankheiten mit erhöhter Inflammation auf. Paunel-Görgülü *et al.* konnten am ersten Tag nach Polytrauma eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins *myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1) und erniedrigte Expression des pro-apoptotischen Proteins *Bcl-2-associated X protein* (Bax) nachweisen, was in erniedrigter Caspase-9 Aktivität und demnach Reduzierung des intrinsischen Weges der Apoptose resultierte.<sup>153,158</sup> Auch zeigte sich eine Involvierung von NF- $\kappa$ B in die Regulierung des intrinsischen Weges, da NF- $\kappa$ B für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 kodiert, was durch Aktivierung bei Inflammation dementsprechend vermehrt exprimiert wird.<sup>159</sup> Verstärkte Bedeutung gewann der intrinsische Weg durch die Erkenntnis, dass auch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-8 und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) in der BAL von ARDS Patienten vermehrt nachzuweisen ist und ebenfalls die Bcl-2 Wirkung verstärkt.<sup>160,161</sup> Aber auch der extrinsische Weg der Apoptose über den Fas-Rezeptor, Mitglied der TNF-Rezeptor Familie, scheint in die Reduktion der granulozytären Apoptose nach Trauma involviert. Nach ihrer Aktivierung durch Liganden bilden Fas-Rezeptoren respektive TNF-Rezeptoren intrazelluläre

Todesdomänen, welche pro-Caspase-8 in ihre aktive Form überführen.<sup>162,163</sup> Im Serum von Polytraumapatienten fanden sich erhöhte Konzentration von löslichem Fas-Rezeptor (SFas), welcher über eine Hemmung der Fas-Rezeptor Kaskade anti-apoptotisch wirkt.<sup>84</sup> Zudem konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B Aktivierung den apoptotischen Effekt von Caspase-8 mildert.<sup>164</sup> Genauere Untersuchungen werden benötigt, um den Einfluss der verschiedenen Regulationsmechanismen der Apoptose in neutrophilen Granulozyten nach Trauma und HS zu beleuchten und zu bewerten. In Bezug auf den Einfluss von Ethanol auf die Apoptoserate nach Trauma konnte die Arbeitsgruppe von Shults *et al.* vor Kurzem im Mausmodell zeigen, dass die Fähigkeit von AM zur Wiederherstellung der Gewebemöostase in der Lunge durch Ethanolgabe gehemmt wird. In ihrem Verbrennungswunden Modell zeigte sich eine Reduktion der Anzahl von AM in der BAL um 50% im Vergleich zu *sham* operierten Tieren. Die verbliebenen AM zeigten eine Änderung ihres Phänotyps durch PRR-Stimulation hin zu pro-inflammatorischen AM.<sup>165</sup> Im Gegensatz zu AM, die PMNL oder Alveolarepithelzell-Typ (AT)2-Zellen phagozytieren, anti-inflammatorische Zytokine sezernieren und so zur Wiederherstellung der Gewebemöostase beitragen, sezernieren AM, welche bakterielle Antigene phagozytieren, verstärkt zur Chemotaxis anderer Leukozyten und Verstärkung einer pro-inflammatorischen Antwort bei, wie Seitz *et al.* zeigen konnten.<sup>62</sup> Shults *et al.* postulierten, dass Ethanol die Wiederherstellung der Gewebemöostase verzögert. Die durch Alkohol weiter erniedrigte Apoptoserate in der TxT+H/R Gruppe scheint diese Annahme zu unterstützen. Zudem konnten Vorversuche unserer Arbeitsgruppe belegen, dass Alkohol die Apoptose in humanen A549 Alveolarepithelzellen über eine verminderte Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B p65 Einheit vermindert.<sup>166</sup> Es wird in weiteren Experimenten zu überprüfen sein, ob dieser Mechanismus auf neutrophile Granulozyten übertragen werden kann. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die verminderte lokale und systemische Inflammation durch Ethanolgabe nicht zur Rückkehr der Apoptoserate auf Ursprungsniveau führte, sondern die Apoptoserate weiter senkte. Dieser Trend konnte auch in *sham*-operierten Tieren beobachtet werden.

Da Immunsuppression eine wesentliche Komplikation von Alkoholkonsum darstellt und dem Inflammasom eine Schlüsselrolle in der Genese der inflammatorischen Immunantwort durch das angeborene Immunsystem zukommt, haben wir dessen Aktivität durch Bestimmung der Caspase-1 gemessen.<sup>45,51,167</sup> Obwohl wir in zirkulierenden neutrophilen Granulozyten keine erhöhte Aktivierung des Inflammasoms

nach TxT und HS feststellen konnten, verminderte vorherige Alkoholgabe die Caspase-1 Aktivität sowohl bei *sham* operierten Tieren als auch bei solchen, die dem chirurgischen Prozedere unterzogen wurden. Hoyt *et al.* konnten jüngst zeigen, dass Alkohol in verschiedenen Zellreihen wie murinen Makrophagen und Neutrophilen sowie humanen mononukleären Zellen die Inflammasomaktivierung durch Stimulation von Phosphatasen, dementsprechend verminderte Phosphorylierung von ASC Verhinderung von ASC-ASC Interaktionen, welche notwendig sind für die Zusammenlagerung des Nlrp3-Inflammasoms, hemmt, und so die Aktivierung von Caspase-1 und Sezernierung von IL-1 $\beta$  und IL-18 reduziert.<sup>93</sup> Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass Ethanol den kanonischen Weg der NF- $\kappa$ B Aktivierung hemmt.<sup>94</sup> NF- $\kappa$ B reguliert die Synthese der Inflammasombestandteile und verminderte Nlrp3 Genexpression in Monozyten von Traumapatienten resultierte in stark verminderter IL-1 $\beta$  Sekretion.<sup>43,168</sup> In zirkulierenden Monozyten konnten wir in unserem Modell nach TxT und HS eine verstärkte Aktivität des Inflammasoms durch vermehrte Expression von Caspase-1 zeigen, welche in Einklang mit oben genannten Studien durch Ethanol signifikant gehemmt wurde. Ethanol reduzierte demnach die systemische Initiierung der Entzündungsantwort in zirkulierenden Monozyten und Granulozyten bereits in der Hemmung des Inflammasoms. Weitere Versuche werden benötigt, um den genauen Zeitpunkt und die Mechanismen der Hemmung des Inflammasoms in der Genese der posttraumatischen Immunantwort zu untersuchen.

Hazeldine *et al.* postulierten, die systemische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sei an der Erhöhung deren CD62L Expression und Erniedrigung der CD11b Expression zu erkennen.<sup>75</sup> In Einklang mit dieser These sahen wir unserem Modell des stumpfen Thoraxtraumas und hämorrhagischen Schocks eine Aktivierung des zirkulierenden Granulozytenverbandes, welche in erhöhter Infiltration von PMNL in die Lunge und dort zu vermehrtem Gewebeschaden und lokaler Inflammation führte, Effekte, die durch Alkohol vermindert werden konnten. Ähnliche Daten hatten bereits Oh und Diamond veröffentlicht, die den Effekt von Alkohol in physiologischen Dosen auf Neutrophilen Adhärenz, Bindungs- und Migrationsverhalten an stimuliertem Endothel untersucht hatte. Sie berichteten über eine reduzierte Adhärenz, Bindungsdauer und -festigkeit auf P-Selectin Oberflächen bei einer Vorbehandlung der neutrophilen Granulozyten mit Ethanol.<sup>169</sup> Diese Daten weisen auf die Fähigkeit von Alkohol hin, die TEM von neutrophilen Granulozyten zu reduzieren, was durch unsere Ergebnisse bestätigt wird.

Zusammenfassend lassen sich für unsere Studie folgende Hauptaussagen definieren:

- I. TxT und HS führen in einem Kombinationsmodell am Kleintier zu Verletzungsmustern, welche konkordant sind mit beobachteten Verletzungen polytraumatisierter Patienten. Auch der Einfluss akuter Alkoholintoxikation auf das kardiovaskuläre System zeigt sich übereinstimmend zwischen traumatisierten Kleintieren und Traumatpatienten.
- II. TxT und HS führen zu einer systemischen Aktivierung von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Kleintiermodell. Aktivierte zirkulierende Monozyten zeigen eine erhöhte Aktivität des Inflammasoms. Aktivierte neutrophile Granulozyten zeigen nach TxT und HS im Kleintiermodell eine erniedrigte Apoptoserate.
- III. TxT und HS führen im Kleintiermodell zur verstärkten Migration von PMNL ins Lungengewebe, was mit erhöhter lokaler Inflammation, Schädigung des Lungenparenchyms und erhöhtem Kapillarleck verbunden ist.
- IV. Akute Alkoholintoxikation reduziert die systemische Aktivierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten als auch die Infiltration von PMNL ins Lungenparenchym im Kleintiermodell, wahrscheinlich *via* Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Dies resultiert in einer verminderten lokaler Entzündungsreaktion und führt zur Reduktion des durch TxT und HS erzeugten Gewebeschadens.
- V. Interessanterweise führt akute Alkoholintoxikation und die durch Ethanol reduzierte Inflammation nicht zur Wiederherstellung der Apoptoseraten in neutrophilen Granulozyten, sondern zu deren weiteren Absinken.

Mit den in der Studie gewonnenen Ergebnissen konnten wir weitere Erkenntnisse für die Entwicklung von immunologischen Komplikationen nach Polytrauma liefern und zeigen, welche Effekte Alkohol auf deren Genese ausübt. Weitere Studien werden benötigt, die genauen Signalwege hinter den gewonnenen Ergebnissen zu beleuchten, den Einfluss der Schwere der Alkoholintoxikation und die Kinetik der Immunsuppression weiter zu

untersuchen und die Ergebnisse in der Behandlung posttraumatischer Komplikationen potenziell anzuwenden.

## 4. Literaturverzeichnis der übergreifenden Zusammenfassung

1. Sakran JV, Greer SE, Werlin E, McCunn M. Care of the injured worldwide: trauma still the neglected disease of modern society. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:64. doi:10.1186/1757-7241-20-64.
2. Alberdi F, García I, Atutxa L, Zabarte M. Epidemiology of severe trauma. *Med Intensiva*. 2014;38(9):580-588. doi:10.1016/j.medin.2014.06.012.
3. Chignalia AZ, Yetimakman F, Christiaans SC, et al. THE GLYCOLYX AND TRAUMA: A REVIEW. *Shock*. 2016;45(4):338-348. doi:10.1097/SHK.0000000000000513.
4. Cothren CC, Moore EE, Hedegaard HB, Meng K. Epidemiology of urban trauma deaths: a comprehensive reassessment 10 years later. *World J Surg*. 2007;31(7):1507-1511. doi:10.1007/s00268-007-9087-2.
5. Barelli S, Alberio L. The Role of Plasma Transfusion in Massive Bleeding: Protecting the Endothelial Glycocalyx? *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:91. doi:10.3389/fmed.2018.00091.
6. Esmer E, Derst P, Lefering R, Schulz M, Siekmann H, Delank K-S. Präklinische Einschätzung der Verletzungsart und –schwere beim Schwerverletzten durch den Notarzt : Eine Auswertung des TraumaRegister DGU®. *Unfallchirurg*. 2017;120(5):409-416. doi:10.1007/s00113-015-0127-3.
7. Demetriades D, Murray J, Charalambides K, et al. Trauma fatalities: time and location of hospital deaths. *J Am Coll Surg*. 2004;198(1):20-26. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2003.09.003.
8. Fröhlich M, Lefering R, Probst C, et al. Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma: an analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76(4):921-7; discussion 927-8. doi:10.1097/TA.000000000000199.
9. Dewar D, Moore FA, Moore EE, Balogh Z. Postinjury multiple organ failure. *Injury*. 2009;40(9):912-918. doi:10.1016/j.injury.2009.05.024.
10. Sauaia A, Moore FA, Moore EE. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2017;33(1):167-191. doi:10.1016/j.ccc.2016.08.006.
11. Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. *Pathol Res Pract*. 2010;206(3):145-150. doi:10.1016/j.prp.2009.12.002.
12. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1685-1693. doi:10.1056/NEJMoa050333.
13. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993;341(8846):643-647.
14. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, et al. The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1152-1159. doi:10.1097/01.CCM.0000207343.53990.A8.
15. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*. 1983;249(2):28-35.
16. Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. Pathophysiologie des Polytraumas. *Chirurg*. 2013;84(9):753-758. doi:10.1007/s00104-013-2477-0.
17. Dutton RP, Stansbury LG, Leone S, Kramer E, Hess JR, Scalea TM. Trauma mortality in mature trauma systems: are we doing better? An analysis of trauma mortality patterns, 1997-2008. *J Trauma*. 2010;69(3):620-626. doi:10.1097/TA.0b013e3181bbfe2a.

18. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2224-2260. doi:10.1016/S0140-6736(12)61766-8.
19. Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, Sempos CT. The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction*. 2003;98(9):1209-1228.
20. Rehm J, Baliunas D, Borges GLG, et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction*. 2010;105(5):817-843. doi:10.1111/j.1360-0443.2010.02899.x.
21. Cherpitel CJ, Ye Y, Bond J, Borges G, Monteiro M. Relative risk of injury from acute alcohol consumption: modeling the dose-response relationship in emergency department data from 18 countries. *Addiction*. 2015;110(2):279-288. doi:10.1111/add.12755.
22. Cherpitel CJ. Alcohol and injuries: a review of international emergency room studies since 1995. *Drug Alcohol Rev*. 2007;26(2):201-214. doi:10.1080/09595230601146686.
23. Cherpitel CJ, Ye Y, Bond J, et al. Alcohol Attributable Fraction for Injury Morbidity from the Dose-Response Relationship of Acute Alcohol Consumption: Emergency Department Data from 18 Countries. *Addiction*. 2015;110(11):1724-1732. doi:10.1111/add.13031.
24. Borges G, Cherpitel CJ, Orozco R, et al. Acute alcohol use and the risk of non-fatal injury in sixteen countries. *Addiction*. 2006;101(7):993-1002. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01462.x.
25. Rivara FP, Jurkovich GJ, Gurney JG, et al. The magnitude of acute and chronic alcohol abuse in trauma patients. *Arch Surg*. 1993;128(8):907-12; discussion 912-3. doi:10.1001/archsurg.1993.01420200081015.
26. Kool B, Ameratunga S, Jackson R. The role of alcohol in unintentional falls among young and middle-aged adults: a systematic review of epidemiological studies. *Inj Prev*. 2009;15(5):341-347. doi:10.1136/ip.2008.021303.
27. Pories SE, Gamelli RL, Vacek P, Goodwin G, Shinozaki T, Harris F. Intoxication and injury. *J Trauma*. 1992;32(1):60-64.
28. Ristic B, Rancic N, Maksimovic M, Ignjatovic-Ristic D. The influence of alcohol intoxication on the severity of injuries suffered by drivers in road traffic accidents. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2013;39(4):363-368. doi:10.1007/s00068-013-0276-4.
29. Waller PF, Stewart JR, Hansen AR, Stutts JC, Popkin CL, Rodgman EA. The potentiating effects of alcohol on driver injury. *JAMA*. 1986;256(11):1461-1466.
30. Stübig T, Petri M, Zeckey C, et al. Alcohol intoxication in road traffic accidents leads to higher impact speed difference, higher ISS and MAIS, and higher preclinical mortality. *Alcohol*. 2012;46(7):681-686. doi:10.1016/j.alcohol.2012.07.002.
31. Bird MD, Choudhry MA, Molina PE, Kovacs EJ. Alcohol and trauma: a summary of the Satellite Symposium at the 30th Annual Meeting of the Shock Society. *Alcohol*. 2009;43(3):247-252. doi:10.1016/j.alcohol.2008.12.006.
32. Nau C, Wutzler S, Dörr H, et al. Liver cirrhosis but not alcohol abuse is associated with impaired outcome in trauma patients - a retrospective, multicentre study. *Injury*. 2013;44(5):661-666. doi:10.1016/j.injury.2012.06.013.
33. Heymann C von, 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.
34. Relja B, Menke J, WAGNER N, et al. Effects of positive blood alcohol concentration on outcome and systemic interleukin-6 in major trauma patients. *Injury*. 2016;47(3):640-645. doi:10.1016/j.injury.2016.01.016.

35. Daurat A, Millet I, Roustan J-P, et al. Thoracic Trauma Severity score on admission allows to determine the risk of delayed ARDS in trauma patients with pulmonary contusion. *Injury*. 2016;47(1):147-153. doi:10.1016/j.injury.2015.08.031.
36. Seitz DH, Perl M, Liener UC, et al. Inflammatory alterations in a novel combination model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2011;70(1):189-196. doi:10.1097/TA.0b013e3181d7693c.
37. Manson J, Thiemermann C, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*. 2012;99 Suppl 1:12-20. doi:10.1002/bjs.7717.
38. Visser T, Hietbrink F, Groeneveld KM, Koenderman L, Leenen LPH. Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2011;37(2):177-184. doi:10.1007/s00068-010-0041-x.
39. Lord JM, Midwinter MJ, Chen Y-F, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet*. 2014;384(9952):1455-1465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60687-5.
40. Kovtun A, Messerer DAC, Scharffetter-Kochanek K, Huber-Lang M, Ignatius A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res*. 2018;2018:8173983. doi:10.1155/2018/8173983.
41. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
42. Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, et al. Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(2):251-259. doi:10.1007/s00423-010-0645-y.
43. Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Curr Biol*. 2016;26(13):R568-R572. doi:10.1016/j.cub.2016.02.019.
44. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*. 2000;38(1):31-40.
45. Sha W, Mitoma H, Hanabuchi S, et al. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):16059-16064. doi:10.1073/pnas.1412487111.
46. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2018;187:133-149. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.011.
47. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*. 2002;10(2):417-426.
48. Place DE, Kanneganti T-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol*. 2018;50:32-38. doi:10.1016/j.coi.2017.10.011.
49. Elliott JM, Rouge L, Wiesmann C, Scheer JM. Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *J Biol Chem*. 2009;284(10):6546-6553. doi:10.1074/jbc.M806121200.
50. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992;356(6372):768-774. doi:10.1038/356768a0.
51. Arbore G, Kemper C. A novel "complement-metabolism-inflammasome axis" as a key regulator of immune cell effector function. *Eur J Immunol*. 2016;46(7):1563-1573. doi:10.1002/eji.201546131.
52. Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol*. 1993;13(10):6231-6240.
53. Gasse P, Riteau N, Charron S, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(10):903-913. doi:10.1164/rccm.200808-1274OC.

54. Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M, et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. *J Immunol.* 2014;192(12):5974-5983. doi:10.4049/jimmunol.1400368.
55. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(11):1225-1234. doi:10.1164/rccm.201201-0003OC.
56. Xu P, Wen Z, Shi X, et al. Hemorrhagic shock augments Nlrp3 inflammasome activation in the lung through impaired pyrin induction. *J Immunol.* 2013;190(10):5247-5255. doi:10.4049/jimmunol.1203182.
57. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* 1990;10(4):1498-1506.
58. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990;10(5):2327-2334.
59. Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol.* 1993;13(10):6137-6146.
60. Ohtsuka T, Kubota A, Hirano T, et al. Glucocorticoid-mediated gene suppression of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, through impairment of NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 1996;271(3):1651-1659.
61. Widmer U, Manogue KR, Cerami A, Sherry B. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 1993;150(11):4996-5012.
62. Seitz DH, Palmer A, Niesler U, et al. Alveolar macrophage phagocytosis is enhanced after blunt chest trauma and alters the posttraumatic mediator release. *Shock.* 2011;36(6):621-627. doi:10.1097/SHK.0b013e318234f8a0.
63. Bhatia RK, Pallister I, Dent C, Jones SA, Topley N. Enhanced neutrophil migratory activity following major blunt trauma. *Injury.* 2005;36(8):956-962. doi:10.1016/j.injury.2005.03.009.
64. Modig J, Hällgren R. Pathophysiologic significance of lung granulocytes in human adult respiratory distress syndrome induced by septic or traumatic shock. *Acta Chir Scand.* 1987;153(4):267-271.
65. Stensballe J, Christiansen M, Tønnesen E, Espersen K, Lippert FK, Rasmussen LS. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(4):515-521. doi:10.1111/j.1399-6576.2008.01801.x.
66. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.* 2013;50(1):7-22. doi:10.1177/0300985812469883.
67. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156.
68. McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 1997;100(3):485-491. doi:10.1172/JCI119556.
69. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science.* 2003;301(5640):1720-1725. doi:10.1126/science.1084174.
70. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11-25. doi:10.1016/0092-8674(92)90115-S.
71. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol.* 2004;5(4):393-400. doi:10.1038/ni1051.

72. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006;203(12):2569-2575. doi:10.1084/jem.20060925.
73. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol*. 2006;80(4):714-718. doi:10.1189/jlb.1105645.
74. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;41(5):694-707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008.
75. Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. The impact of trauma on neutrophil function. *Injury*. 2014;45(12):1824-1833. doi:10.1016/j.injury.2014.06.021.
76. Hazeldine J, Naumann DN, Toman E, et al. Prehospital immune responses and development of multiple organ dysfunction syndrome following traumatic injury: A prospective cohort study. *PLoS Med*. 2017;14(7):e1002338. doi:10.1371/journal.pmed.1002338.
77. Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol*. 2004;111(1-2):56-66. doi:10.1159/000074486.
78. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest*. 1976;58(3):705-715. doi:10.1172/JCI108517.
79. Yum H-K, Arcaroli J, Kupfner J, et al. Involvement of Phosphoinositide 3-Kinases in Neutrophil Activation and the Development of Acute Lung Injury. *J Immunol*. 2001;167(11):6601-6608. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6601.
80. Parsey MV, Kaneko D, Shenkar R, Abraham E. Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of interleukin-1beta. *Chest*. 1999;116(1 Suppl):67S-68S.
81. Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, Winchurch RA. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol*. 1996;59(6):835-839. doi:10.1002/jlb.59.6.835.
82. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003;31(4 Suppl):S184-8. doi:10.1097/01.CCM.0000057841.33876.B1.
83. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2006;10(6):R155. doi:10.1186/cc5090.
84. Paunel-Görgülü A, Flohé S, Scholz M, Windolf J, Lögters T. Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Crit Care*. 2011;15(1):R20. doi:10.1186/cc9965.
85. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(6):1969-1977. doi:10.1164/ajrccm.156.6.96-12081.
86. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1993;54(4):283-288. doi:10.1002/jlb.54.4.283.
87. Jurkovich GJ. The Effect of Acute Alcohol Intoxication and Chronic Alcohol Abuse on Outcome From Trauma. *JAMA*. 1993;270(1):51. doi:10.1001/jama.1993.03510010057029.
88. Wagner N, Akbarpour A, Mörs K, et al. Alcohol Intoxication Reduces Systemic Interleukin-6 Levels and Leukocyte Counts After Severe TBI Compared With Not Intoxicated TBI Patients. *Shock*. 2016;46(3):261-269. doi:10.1097/SHK.0000000000000620.

89. Relja B, Höhn C, Bormann F, et al. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 2012;165(4b):1188-1199. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01595.x.
90. Relja B, Henrich D, Wetzel G, et al. Effects of acute ethanol gavage on intestinal integrity after hemorrhage/resuscitation. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48(4):448-458. doi:10.3109/00365521.2013.772228.
91. Maier RV. Ethanol abuse and the trauma patient. *Surg Infect (Larchmt)*. 2001;2(2):133-41; discussion 141-4. doi:10.1089/109629601750469456.
92. Relja B, Omid N, Schaible A, et al. Pre- or post-treatment with ethanol and ethyl pyruvate results in distinct anti-inflammatory responses of human lung epithelial cells triggered by interleukin-6. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2991-2998. doi:10.3892/mmr.2015.3764.
93. Hoyt LR, Ather JL, Randall MJ, et al. Ethanol and Other Short-Chain Alcohols Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation through Protein Tyrosine Phosphatase Stimulation. *J Immunol*. 2016;197(4):1322-1334. doi:10.4049/jimmunol.1600406.
94. Mörs K, Hörauf J-A, Kany S, et al. Ethanol Decreases Inflammatory Response in Human Lung Epithelial Cells by Inhibiting the Canonical NF- $\kappa$ B-Pathway. *CPB*. 2017;43(1):17-30. doi:10.1159/000480313.
95. Boé DM, Nelson S, Zhang P, Quinton L, Bagby GJ. Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the host defense response to *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(11):1838-1845. doi:10.1097/01.ALC.0000095634.82310.53.
96. Patel M, Keshavarzian A, Kottapalli V, Badie B, Winship D, Fields JZ. Human neutrophil functions are inhibited in vitro by clinically relevant ethanol concentrations. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(2):275-283.
97. Pan J, McEver RP. Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF- $\kappa$ B/Rel family. *J Biol Chem*. 1995;270(39):23077-23083.
98. Schindler U, Baichwal VR. Three NF- $\kappa$ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol*. 1994;14(9):5820-5831.
99. Bunting K, Rao S, Hardy K, et al. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF- $\kappa$ B transcription factor c-Rel. *J Immunol*. 2007;178(11):7097-7109.
100. Wagner N, Franz N, Dieteren S, et al. Acute Alcohol Binge Deteriorates Metabolic and Respiratory Compensation Capability After Blunt Chest Trauma Followed by Hemorrhagic Shock-A New Research Model. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017;41(9):1559-1567. doi:10.1111/acer.13446.
101. Liener UC, Knöferl MW, Sträter J, et al. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock*. 2003;20(6):511-516. doi:10.1097/01.shk.0000095057.62263.fb.
102. Seitz DH, Perl M, Mangold S, et al. Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock*. 2008;30(5):537-544. doi:10.1097/SHK.0b013e31816a394b.
103. Lehnert M, Relja B, Sun-Young Lee V, et al. A peptide inhibitor of C-jun N-terminal kinase modulates hepatic damage and the inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*. 2008;30(2):159-165. doi:10.1097/SHK.0b013e31815dd623.
104. Relja B, Schwestka B, Lee VS-Y, et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and inflammatory response in male rats. *Shock*. 2009;32(5):509-516. doi:10.1097/SHK.0b013e3181a2530d.
105. Wagner N, Dieteren S, Franz N, et al. Ethyl pyruvate ameliorates hepatic injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock by reducing local inflammation, NF- $\kappa$ B activation and HMGB1 release. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0192171. doi:10.1371/journal.pone.0192171.

106. Franz N, Dieteren S, Köhler K, et al. Alcohol Binge Reduces Systemic Leukocyte Activation and Pulmonary PMN Infiltration After Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock. *Inflammation*. 2018. doi:10.1007/s10753-018-0927-z.
107. Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC. Fas (CD95) Induces Alveolar Epithelial Cell Apoptosis in Vivo: Implications for Acute Pulmonary Inflammation. *Am J Pathol*. 2001;158(1):153-161.
108. Denk S, Weckbach S, Eisele P, et al. Role of Hemorrhagic Shock in Experimental Polytrauma. *Shock*. 2018;49(2):154-163. doi:10.1097/SHK.0000000000000925.
109. Relja B, Töttel E, Breig L, et al. Effects of green tea catechins on the pro-inflammatory response after haemorrhage/resuscitation in rats. *Br J Nutr*. 2011;105(12):1791-1797. doi:10.1017/S000711451000560X.
110. Relja B, Wagner N, Franz N, et al. Ethyl pyruvate reduces acute lung damage following trauma and hemorrhagic shock via inhibition of NF- $\kappa$ B and HMGB1. *Immunobiology*. 2018;223(3):310-318. doi:10.1016/j.imbio.2017.10.037.
111. González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14660-14671. doi:10.3748/wjg.v20.i40.14660.
112. Maraslioglu M, Weber R, Korff S, et al. Activation of NF- $\kappa$ B after chronic ethanol intake and haemorrhagic shock/resuscitation in mice. *British Journal of Pharmacology*. 2013;170(3):506-518. doi:10.1111/bph.12224.
113. Maraslioglu M, Oppermann E, Blattner C, et al. Chronic ethanol feeding modulates inflammatory mediators, activation of nuclear factor- $\kappa$ B, and responsiveness to endotoxin in murine Kupffer cells and circulating leukocytes. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:808695. doi:10.1155/2014/808695.
114. Curry N, Hopewell S, Dorée C, Hyde C, Brohi K, Stanworth S. The acute management of trauma hemorrhage: a systematic review of randomized controlled trials. *Crit Care*. 2011;15(2):R92. doi:10.1186/cc10096.
115. Hildebrand F, Giannoudis PV, van Griensven M, et al. Management of polytraumatized patients with associated blunt chest trauma: a comparison of two European countries. *Injury*. 2005;36(2):293-302. doi:10.1016/j.injury.2004.08.012.
116. Scheyerer MJ, Dütschler J, Billeter A, et al. Effect of elevated serum alcohol level on the outcome of severely injured patients. *Emerg Med J*. 2014;31(10):813-817. doi:10.1136/emered-2013-202804.
117. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998;9(1):1-11.
118. Majde JA. Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S100-5. doi:10.1097/01.TA.0000064503.24416.F4.
119. Mario Perl, Florian Gebhard, Uwe B. Brückner, Alfred Ayala, Sonja Braumüller, Christian Büttner, Lothar Kinzl, Markus W. Knöferl. Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge\*. *Crit Care Med*. 2005;33(6):1351-1358. doi:10.1097/01.CCM.0000166352.28018.A9.
120. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F. Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock*. 2004;22(1):51-56.
121. Relja B, Wilhelm K, Wang M, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Acute ethanol gavage attenuates hemorrhage/resuscitation-induced hepatic oxidative stress in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:983427. doi:10.1155/2012/983427.
122. Tsukamoto T, Pape HC. Animal models for trauma research: what are the options? *Shock*. 2009;31(1):3-10. doi:10.1097/SHK.0b013e31817fdabf.

123. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, et al. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock*. 2003;19(6):519-525. doi:10.1097/01.shk.0000070739.34700.f6.
124. Ohnishi M, Kirkman E, Guy RJ, Watkins PE. Reflex nature of the cardiorespiratory response to primary thoracic blast injury in the anaesthetised rat. *Exp Physiol*. 2001;86(3):357-364.
125. Phelan H, Stahls P, Hunt J, Bagby GJ, Molina PE. Impact of alcohol intoxication on hemodynamic, metabolic, and cytokine responses to hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2002;52(4):675-682. doi:10.1097/00005373-200204000-00010.
126. Molina PE, Zambell KL, Norenberg K, et al. Consequences of alcohol-induced early dysregulation of responses to trauma/hemorrhage. *Alcohol*. 2004;33(3):217-227. doi:10.1016/j.alcohol.2004.07.002.
127. Bilello J, McCray V, Davis J, Jackson L, Danos LA. Acute ethanol intoxication and the trauma patient: hemodynamic pitfalls. *World J Surg*. 2011;35(9):2149-2153. doi:10.1007/s00268-011-1191-7.
128. Horst K, Simon TP, Pfeifer R, et al. Characterization of blunt chest trauma in a long-term porcine model of severe multiple trauma. *Sci Rep*. 2016;6:39659. doi:10.1038/srep39659.
129. Wu X-J, Liu H-M, Song X-M, et al. Penethylidone hydrochloride inhibits TLR4 signaling and inflammation, and attenuates blunt chest trauma and hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6327-6336. doi:10.3892/mmr.2018.8644.
130. Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Alcohol-induced regulation of nuclear regulatory factor-kappa beta in human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(6):988-994.
131. Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(1):135-139. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00012.x.
132. Groeneveld KM, Hietbrink F, Hardcastle TC, Warren BL, Koenderman L, Leenen LPH. Penetrating thorax injury leads to mild systemic activation of neutrophils without inflammatory complications. *Injury*. 2014;45(3):522-527. doi:10.1016/j.injury.2013.09.030.
133. Junger WG, Rhind SG, Rizoli SB, et al. Prehospital hypertonic saline resuscitation attenuates the activation and promotes apoptosis of neutrophils in patients with severe traumatic brain injury. *Shock*. 2013;40(5):366-374. doi:10.1097/SHK.0000000000000038.
134. Cocks RA, Chan TY. Alteration in leukocyte adhesion molecule expression following minor, moderate and major trauma. *Eur J Emerg Med*. 1997;4(4):193-195.
135. Cocks RA, Chan TY, Rainer TH. Leukocyte L-selectin is up-regulated after mechanical trauma in adults. *J Trauma*. 1998;45(1):1-6.
136. Mommsen P, Barkhausen T, Hildebrand F, Zeckey C, Krettek C, van Griensven M. Regulation of L-selectin expression by trauma-relevant cytokines. *Pathol Res Pract*. 2011;207(3):142-147. doi:10.1016/j.prp.2010.12.003.
137. Tu L, Poe JC, Kadono T, et al. A Functional Role for Circulating Mouse L-Selectin in Regulating Leukocyte/Endothelial Cell Interactions In Vivo. *J Immunol*. 2002;169(4):2034-2043. doi:10.4049/jimmunol.169.4.2034.
138. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-311. doi:10.1189/jlb.0905496.

139. Scannell G, Waxman K, Vaziri ND, et al. Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b, and CD18 expressions. *J Trauma*. 1995;39(4):641-644.
140. White-Owen C, Alexander JW, Babcock GF. Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury. *Journal of Surgical Research*. 1992;52(1):22-26. doi:10.1016/0022-4804(92)90273-3.
141. Maekawa K, Futami S, Nishida M, et al. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma*. 1998;44(3):460-468.
142. van Spriel AB, Leusen JH, van Egmond M, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*. 2001;97(8):2478-2486.
143. Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelø H, et al. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1994;56(1):80-87. doi:10.1002/jlb.56.1.80.
144. Sengelø H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J. Clin. Invest*. 1993;92(3):1467-1476. doi:10.1172/JCI116724.
145. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1317-1327. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008.
146. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Peterson VM, Goode AW. Base deficit after major trauma directly relates to neutrophil CD11b expression: a proposed mechanism of shock-induced organ injury. *Intensive Care Med*. 1997;23(5):504-509.
147. Driete G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):820-832. doi:10.1097/CCM.0b013e318274647d.
148. Hietbrink F, Koenderman L, Althuisen M, Leenen LPH. Modulation of the innate immune response after trauma visualised by a change in functional PMN phenotype. *Injury*. 2009;40(8):851-855. doi:10.1016/j.injury.2008.11.002.
149. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1993;178(2):449-460.
150. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, et al. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol*. 1999;162(5):3022-3030.
151. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-627. doi:10.1182/blood-2010-01-259028.
152. Anne Morrison C, Moran A, Patel S, Vidaurre MdPH, Carrick MM, Tweardy DJ. Increased apoptosis of peripheral blood neutrophils is associated with reduced incidence of infection in trauma patients with hemorrhagic shock. *J Infect*. 2013;66(1):87-94. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.001.
153. Paunel-Görgülü A, Kirichevska T, Lögters T, Windolf J, Flohé S. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Mol Med*. 2012;18:325-335. doi:10.2119/molmed.2011.00380.
154. Cepero E, King AM, Coffey LM, Perez RG, Boise LH. Caspase-9 and effector caspases have sequential and distinct effects on mitochondria. *Oncogene*. 2005;24(42):6354-6366. doi:10.1038/sj.onc.1208793.
155. Daigle I, Simon HU. Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126(2):147-156. doi:10.1159/000049506.

156. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12815-12819. doi:10.1073/pnas.0707715105.
157. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RL de, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. 2013;14:32. doi:10.1186/1471-2121-14-32.
158. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, et al. Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation. *J Immunol*. 2009;183(10):6198-6206. doi:10.4049/jimmunol.0901264.
159. Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene*. 2001;20(50):7342-7351. doi:10.1038/sj.onc.1204926.
160. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Delays Neutrophil Constitutive Apoptosis Through Phosphoinositide 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *J Immunol*. 2000;164(8):4286-4291. doi:10.4049/jimmunol.164.8.4286.
161. Goodman ER. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Its Receptor in the Genesis of Acute Respiratory Distress Syndrome Through an Effect on Neutrophil Apoptosis. *Arch Surg*. 1999;134(10):1049. doi:10.1001/archsurg.134.10.1049.
162. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996;87(3):565-576.
163. Duckett CS. Apoptosis and NF-kappa B: the FADD connection. *J. Clin. Invest*. 2002;109(5):579-580. doi:10.1172/JCI15197.
164. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998;281(5383):1680-1683.
165. Shults JA, Curtis BJ, Boe DM, Ramirez L, Kovacs EJ. Ethanol intoxication prolongs post-burn pulmonary inflammation: role of alveolar macrophages. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):1037-1045. doi:10.1189/jlb.3MA0316-111R.
166. Relja B, OMID N, WAGNER N, et al. Ethanol, ethyl and sodium pyruvate decrease the inflammatory responses of human lung epithelial cells via Akt and NF-κB in vitro but have a low impact on hepatocellular cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;37(2):517-525. doi:10.3892/ijmm.2015.2431.
167. O'Brien M, Moehring D, Muñoz-Planillo R, et al. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *J Immunol Methods*. 2017;447:1-13. doi:10.1016/j.jim.2017.03.004.
168. Kany S, Horstmann J-P, Sturm R, Mörs K, Relja B. Reduced NLRP3 Gene Expression Limits the IL-1β Cleavage via Inflammasome in Monocytes from Severely Injured Trauma Patients. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1752836. doi:10.1155/2018/1752836.
169. Oh H, Diamond SL. Ethanol enhances neutrophil membrane tether growth and slows rolling on P-selectin but reduces capture from flow and firm arrest on IL-1-treated endothelium. *J Immunol*. 2008;181(4):2472-2482.

## 5. Publikation

### 5.1 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen

**Franz N**, Dieteren S, Köhler K, Mörs K, Sturm R, Marzi I, Perl M, Relja B, Wagner N. „Alcohol-binge reduces systemic leucocyte activation and pulmonary PMN infiltration after blunt chest trauma and hemorrhagic shock.” *Inflammation*. 2018 Nov 9. doi: 10.1007/s10753-018-0927-z [Epub ahead of print]

Wagner N, **Franz N**, Dieteren S, Perl M, Mörs K, Marzi I, Relja B. „Acute Alcohol Binge Deteriorates Metabolic and Respiratory Compensation Capability After Blunt Chest Trauma Followed by Hemorrhagic Shock-A New Research Model.”

*Alcohol Clin Exp Res*. 2017 Sep;41(9):1559-1567.

Wagner N, Dieteren S, **Franz N**, Köhler K, Mörs K, Nicin L, Schmidt J, Perl M, Marzi I, Relja B. „Ethyl pyruvate ameliorates hepatic injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock by reducing local inflammation, NF-kappaB activation and HMGB1 release.” *PLoS One*. 2018 Feb 8;13(2):e0192171.

Relja B, Wagner N, **Franz N**, Dieteren S, Mörs K, Schmidt J, Marzi I, Perl M. „Ethyl pyruvate reduces acute lung damage following trauma and hemorrhagic shock via inhibition of NF-κB and HMGB1.” *Immunobiology*. 2018 Mar;223(3):310-318.

Bisherige Präsentation der Forschungsergebnisse auf Kongressen:

**Franz N**, Relja B, Wagner N, Dieteren S, Perl M, Marzi I. „Alcohol-binge reduces pulmonary tissue damage after blunt chest trauma and hemorrhagic shock via inhibiting local, systemic inflammation and neutrophil activity”, als Vortrag auf dem 17. Kongress der European Shock Society, Paris, Frankreich, 2017.

**Franz N**, Wagner N, Dieteren S, Perl M, Marzi I, Relja B. „Alcohol-binge reduces pulmonary inflammation and systemic leucocyte activation after blunt chest trauma and hemorrhagic shock.”, als Vortrag auf den 21. Chirurgischen Forschungstagen in Köln, Deutschland, 2017

Dieteren S, Wagner N, **Franz N**, Nicin L, Perl M, Marzi I, Relja B. „Ethyl pyruvate reduces hepatic injury and local inflammation after blunt chest trauma and hemorrhage/resuscitation”, als Vortrag auf den 20. Chirurgischen Forschungstagen in Magdeburg, Deutschland, 2016

**Franz N**, Wagner N, Dieteren S, Nicin L, Perl M, Marzi I, Relja B. „Alcohol-intoxication provokes differential hemodynamic and inflammatory state depending on timing of abuse prior blunt chest trauma followed by hemorrhage/resuscitation (H/R) *in vivo*”, als Vortrag auf den 20. Chirurgischen Forschungstagen in Magdeburg, Deutschland, 2016

## 5.2 Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation

In der Zeit als Doktorand im wissenschaftlichen Labor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie war ich im Forschungsschwerpunktbereich Polytrauma mit dessen immunologischen Veränderungen tätig. Neben dem im Manuskript dargelegten Thema habe ich mich an mehreren Projekten zu den immunologischen Veränderungen nach Polytrauma beteiligt. Die praktische Durchführung der Versuche erfolgte täglich nach festgelegtem Schema. Da diese mit hohem Arbeitsaufwand verbunden waren und die Proben für mehrere Projekte verwendet wurden, teilte ich mir deren Durchführung tageweise mit Herrn Scott Dieteren. Unterstützt wurden wir hierbei von den Medizinisch-technischen Laborassistentinnen des Forschungslabors. Neben der in dieser Dissertationsschrift dargestellten Thematik lagen die Schwerpunkte auf dem Einfluss von subakuter vs. akuter Ethanol- vs. Ethylpyruvatapplikation auf die Immunantwort nach Thoraxtrauma und Hämorrhagischem Schock.

Zu Beginn der Arbeit half ich an der Etablierung des von Frau Prof. Dr. Borna Relja erstellten Studiendesign mit der zum Teil für die Projekte neu eingeführten Methodik. Die Durchführung der Tierversuche erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Nils Wagner und Herrn Scott Dieteren. Ein Großteil der Arbeit stellte die tägliche Durchführung der Versuche, Verarbeitung der Proben und deren Messungen dar. Alle im Manuskript genannten Methoden und Messungen führte ich selbstständig durch. Bei den täglich durchzuführenden Versuchen sind hier insbesondere RNA-Isolierung, Polymerase Ketten Reaktion, weitere durchflusszytometrische Messungen am *BD FACS Canto 2™*, Antigenneutralisierung mittels Antikörper und ELISA zu nennen.

Zusammen mit Frau Prof. Dr. Borna Relja erarbeitete ich die *Gating*-Strategie am FACS Canto II. Hilfestellung erhielten wir dabei von Frau Elsie Oppermann. Die darauffolgende Akquirierung der Daten wurde von mir vorgenommen. Das veröffentlichte Manuskript schieb ich eigenständig nieder. Die Korrekturleistungen und Hilfestellung bei statistischen und den graphischen Auswertungen erhielt ich von Frau Prof. Dr. Borna Relja. Diese wurden für die übergreifende Zusammenfassung aus der Publikation übernommen. Der Ethikantrag sowie der dazugehörige Abschnitt im Methodenteil der Publikation wurden von Frau Prof. Dr. Borna Relja erstellt. Die Herren Alexander Schaible und Dr. Kernt Köhler sowie Fr. Kerstin Konradowitz und Fr. Katrin Jurida halfen bei den methodischen Auswertungen. Herr Prof. Dr. Ingo Marzi und Herr Prof. Dr. Mario Perl haben intellektuell zum Manuskript und zur Studie beigetragen.

Zusätzlich zur dargestellten Publikation präsentierte ich Ergebnisse meiner Arbeit im Rahmen von zwei Vorträgen auf den 20. Chirurgischen Forschungstagen im September 2016 in Magdeburg sowie als jeweils einem Vortrag auf den 21. Chirurgischen Forschungstagen in Köln und auf dem 17. Kongress der European Shock Society in Paris im September 2017.

## 5.3 Zur Veröffentlichung angenommene Publikationen

*Inflammation*, Vol. 42, No. 2, April 2019 (© 2018)  
DOI: 10.1007/s10753-018-0927-z



ORIGINAL ARTICLE

# Alcohol Binge Reduces Systemic Leukocyte Activation and Pulmonary PMN Infiltration After Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock

Niklas Franz,<sup>1</sup> Scott Dieteren,<sup>1</sup> Kernt Köhler,<sup>2</sup> Katharina Mörs,<sup>1</sup> Ramona Sturm,<sup>1</sup> Ingo Marzi,<sup>1</sup> Mario Perl,<sup>3</sup> Borna Relja,<sup>1,4</sup> and Nils Wagner<sup>1</sup>

**Abstract**— Blunt chest (thoracic) trauma (TxT) and hemorrhagic shock (HS)-induced local and systemic inflammation with increased neutrophil activity often result in an impaired organ function. Next to increasing the trauma risk, binge drinking causes anti-inflammatory effects due to immunomodulatory properties of alcohol (ethanol, EtOH). The impact of clinically relevant acute binge drinking scenario on local and systemic inflammatory changes, notably regarding the activity and longevity of leukocytes, has been analyzed in a combinatory trauma model of TxT + H/R. Twenty-four female Lewis rats (190–240 g) received alcohol (5 g/kg, 30%) or saline gavage. Two hours after alcohol gavage, TxT with subsequent HS (60 min) and resuscitation (TxT + H/R) were induced. Sham-operated animals underwent surgical procedures. Bronchoalveolar lavage fluid (BAL), lung tissue, and blood were harvested 2 h after resuscitation. Pulmonary infiltration with PMN, IL-6 gene expression, systemic PMN activation, neutrophil and monocyte apoptosis (caspase-3/7), and pyroptosis/inflammasome activation (caspase-1) were evaluated. Lung damage was evaluated by hematoxylin-eosin (H/E) staining and determination of the total protein content in BAL (ANOVA,  $p < 0.05$  was significant). TxT + H/R-induced increases in IL-6, PMN infiltration and BAL-protein concentration were significantly reduced by EtOH; however, histological morphology changes after trauma remained unaltered by EtOH. TxT + H/R-induced systemic leukocyte activation (increased CD11b and CD31, reduced CD62L expression) as well as inflammasome activation in monocytes were significantly diminished by EtOH. Apoptosis was prolonged only in PMN after TxT + H/R and was further prolonged by EtOH, an effect that was observed in sham animals as a trend as well. Acute EtOH exposure inhibits the activation of circulating leukocytes after trauma compared to controls. These EtOH-driven systemic changes may be associated with reduced infiltration with PMN after trauma as well as reduced local tissue inflammation.

**KEY WORDS:** ethanol; neutrophils; trauma; CD11b; CD62L; apoptosis; longevity; inflammasome.

<sup>1</sup> Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe-University, 60590 Frankfurt, Germany

<sup>2</sup> Institute of Veterinary Pathology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

<sup>3</sup> BG-Trauma Center Murnau, Murnau, Germany

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed at Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe-University, 60590 Frankfurt, Germany. E-mail: info@bornarelja.com

## INTRODUCTION

Particularly in young patients, trauma causes significant mortality rates worldwide, with approximately 5 million people dying upon traumatic injury [1]. Notably, patients suffering from traumatic brain injuries (47%) and/or chest trauma (46%) as well as hemorrhagic shock, which is

the most preventable cause of death, contribute to patients' mortality [2, 3]. Combinatory trauma consisting of a blunt chest (thoracic) trauma (TxT) and blood loss frequently results in a strong systemic and local inflammatory response to injury, which causes severe tissue damage, and subsequently may lead to multiple organ failure (MOF) or death [4].

The pathogenesis of pulmonary complications is not completely understood. Post-injury lung damage arises from multiple processes as response to microcirculatory disturbances and to the release of pathogen-associated molecular pattern (PAMP), *e.g.*, endotoxins (LPS) and/or damage-associated molecular pattern (DAMP) after tissue damage [5]. This implies an inflammatory process, which is characterized by an excessive release of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6; activation of leukocytes (polymorphonuclear leukocytes, PMN, and monocytes), and pulmonary tissue infiltration with neutrophils, which collectively result in the injury of epithelial cells and the disruption of alveolar-capillary barrier [6, 7]. Activation, localization, and further extravasation of neutrophils from the circulation to injury site involve the modulation of cell adhesion molecules on their cell surface, such as CD62L and CD31 and CD11b/CD18 [8–10]. Although they are required for the clearance of invading PAMP and/or DAMP, not only the presence of activated neutrophils but their function as well contributes to pulmonary damage and dysfunction [6, 11]. As such, neutrophil apoptosis can be delayed after trauma [12], suggesting that their prolonged lifespan indicates a prolonged presence of activated neutrophils in the lungs inducing lung damage [13].

Next to increasing the risk for traumatic injury, alcohol as an immunomodulatory drug is associated with altered inflammatory response upon trauma in both animal studies as well as in trauma patients [14, 15]. As such, alcohol-reduced chemotactic activity of neutrophils, as well as their infiltration into the lung or site of infection, and an impaired expression of neutrophilic adhesion molecules have been observed [16]. At clinically relevant doses, alcohol blunts the ability of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine to upregulate CD11b on neutrophils [17]. Since alcohol consumption is associated with a serious percentage of all hospital admissions and tissue damage as well, in the present study, we characterized the systemic neutrophil biology and lung injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock and determined whether an acute alcohol intoxication prior trauma has any influence on those. We hypothesized that acute alcohol consumption will inhibit the increased systemic activation

of both neutrophils and monocytes and decrease local pulmonary inflammation and lung damage after blunt chest trauma and hemorrhagic shock.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and Experimental Model

The study was approved by the Veterinary Department of the Regional Council in Darmstadt, Germany. The design and reporting of the study are in accordance with the ARRIVE guidelines to optimize the reproducibility of animal studies [18]. Twenty-four female Lewis rats (190–240 g, Janvier Labs, France) were used after an acclimation phase for at least 7 days. Prior experimentation, the animals received a single dose of alcohol (5 g/kg, 30% ethanol, EtOH) to mimic the clinical "drink and drive" scenario or control sodium chloride solution (NaCl 0.9%, vehicle) *via* oral gavage as described before [14, 19].

1.5 h later, the animals received buprenorphine. Mask anesthesia with isoflurane oxygen mixture was applied. The abdomen, chest, right inguinal region, and neck region were shaved; the incision sites were infiltrated with carbostesin; and the right femoral artery was cannulated with polyethylene tubing for monitoring of the blood pressure (BP analyzer, Siemens AG). These procedures lasted around 30 min. Then, the experimentation began.

Bilateral blunt chest (thoracic) trauma (TxT) was induced as described before [19, 20]. Briefly, after placing the animals in a supine position, a cylinder separated by a Mylar polyester film (0.190 mm, DuPont Teijin Films Luxembourg) was located above the ventral thorax. By applying compressed air, the polyester membrane perforated, and a standardized blast wave was provided. After a short stabilization phase of 5 min, the left jugular vein and the right carotid artery were cannulated with polyethylene tubing.

Subsequently, hemorrhagic shock was induced as described before [19]. Briefly, hemorrhage was initiated by withdrawing blood from the right artery into a heparinized syringe until a mean arterial blood pressure (MABP) was reduced to  $35 \pm 3$  mmHg. The MABP was kept constant by further withdrawal or injection of small blood volumes for 60 min. Immediately after hemorrhagic shock, resuscitation followed by transfusing 60% of the shed blood, plus 50% volume of the maximal shed blood volume as lactated Ringer's solution *via* the left jugular vein over 30 min. The catheters were removed, the vessels were

occluded, and the wounds were closed. Two hours later, sacrifice was performed. At this time point, highly relevant inflammatory and pathophysiological changes have been observed after hemorrhagic shock and in the underlying model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock in rats [14, 19, 21, 22]. Figure 1 shows the experimental time line.

### Group Allocation

Animals were randomly subdivided into four groups ( $n=6$  each). The sham groups received either EtOH or vehicle before the beginning of the experiments and underwent all surgical procedures without induction of TxT or H/R. TxT+H/R groups received TxT followed by H/R and either EtOH or vehicle prior trauma.

### Examination of Lung Injury

After obtaining blood samples from the aorta in pyrogen-free heparinized tubes for cytometric flow analyses, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was obtained from the lungs at 2 h after resuscitation. BAL was obtained by instilling 8 ml saline into the lungs via a tracheal cannula and subsequently withdrawing exactly 6 ml BAL. The BAL was centrifuged at  $2000\times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ , and the cell-free supernatant was frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent total protein determination.

Then, the right middle lung lobe was ligated and removed for RNA isolation. The left lung lobe was used for histology. Histological damage of hematoxylin-cosin-stained lung sections ( $3\ \mu\text{m}$ ) has been evaluated by an independent examiner, who evaluated alveolar disruption with alveolar wall thickening and cellular infiltrates, in a blinded manner.

### Quantification of Polymorphonuclear Leukocytes in the Lungs

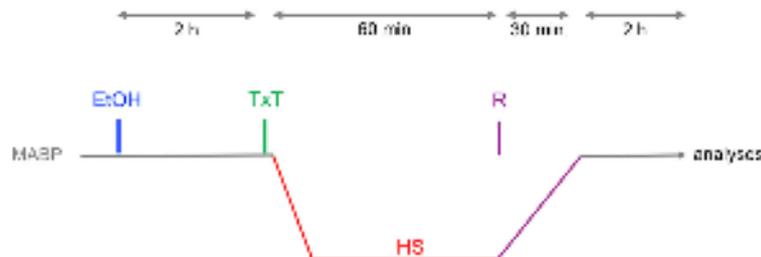
Analysis of lung infiltration with PMN has been performed by a chloroacetate esterase staining (CAE, 4% pararosanilin, 4% sodium nitrite and naphthol solution) for 30 min at room temperature (RT) as described before [23]. All sections were counterstained with hematoxylin. The total number of infiltrating PMN was quantified by counting CAE-positive cells in a total of 20 high-power ( $400\times$ ) fields per section per animal in a blinded manner. Data from each tissue slide were pooled to determine means.

### Ribonucleic Acid (RNA) Isolation, Semi-Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Snap-frozen lung tissue was used for RNA isolation (RNeasy-system, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNase-Free DNase Set was applied to remove DNA (Qiagen, Hilden, Germany). Both quality and amount of the isolated RNA were determined photometrically by using the NanoDrop ND-1000 device (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). One hundred nanograms of total lung RNA was reversely transcribed using the Affinity script QPCR-cDNA synthesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to manufacturer's instructions and as reported before [24]. *IL-6* gene expression was determined using a Stratagene MX3005p QPCR system (Stratagene) and a gene-specific primer for rat interleukin 6 (NM\_012589.2, UniGene#: Rn.9873, Cat#: PPR06483B, SABiosciences, SuperArray, Frederick, MD, USA). mRNA expression of *gapdh* was determined as reference gene expression (rat *Gapdh*, NM\_017008, UniGene#: Rn.91450, Cat#: PPR06557A, SABiosciences). PCR reaction was set up with  $1\times$  RT<sup>2</sup> SYBR Green/Rox qPCR Master mix (SABiosciences) in a  $25\text{-}\mu\text{l}$  volume. A two-step amplification protocol consisting of initial denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 10 min followed by 40 cycles with 15 s denaturation at  $95^\circ\text{C}$  and 60 s annealing/extension at  $60^\circ\text{C}$  was used. Relative expression of the target gene mRNA was calculated by using the comparative threshold-cycle (CT) method ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method). The amount of target mRNA in each sample has been normalized to *gapdh* to provide  $\Delta\text{CT}$  and then to a calibrator consisting of samples obtained from the vehicle sham group. Relative IL-6 mRNA expression is presented as percentage calculated in relation to 100% of the sham group.

### Measurement of Cell Surface Receptor Expression by Flow Cytometry

Blood samples were collected via the aorta in pyrogen-free heparinized tubes at 2 h after resuscitation. Fifty microliters was transferred into polystyrene FACS tubes (BD Pharmingen™) and incubated with FITC mouse anti-rat CD11b (Clone WT.5, BD Bioscience, San Jose, CA), anti-rat CD31 (PECAM-1) PE-Cyanine7 (Clone TLD-3A12, eBioscience, San Diego, CA), and APC mouse anti-rat CD62L (Clone OX-85, BioLegend, San Diego, CA) antibodies. Control stainings with the corresponding isotype antibodies were applied for the settings. After 30 min at RT, 1 ml of the FACS Lysing Solution (BD



**Fig. 1.** Schematic timeline of the experimental design. EtOH ethanol (alcohol) application, HS hemorrhagic shock, MABP mean arterial blood pressure, R resuscitation, TxT blunt chest (thoracic) trauma. The groups received either EtOH or vehicle 2 h before experimentation. Then, HS followed by R was induced, and 2 h later, sacrifice was performed.

Pharmingen™) was added for additional 10 min (RT). Then, samples were centrifuged at 400g for 7 min and washed twice with 2 ml phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin (FACS buffer). After removal of supernatants, cells were diluted in 400  $\mu$ l FACS buffer. Each cell population was defined by gating the corresponding forward and side scatter scan. From each sample, a minimum of  $3.0 \times 10^4$  cells was measured, which were subsequently analyzed. The mean fluorescence units were assessed by flow cytometric analyses using a BD FACS Canto 2™ and FACD DIVA™ software (BD).

#### Caspase-1 and Caspase-3 Activation Assay

Active caspases were quantified by using a FAM-YVAD-FMK 660 caspase-1 detection kit and FAM-DEVD-FLICA caspase-3/7 kit (ImmunoChemistry Technologies) according to the manufacturer's guidelines. Mean fluorescence units (MFU) of the stained cells were quantified by flow cytometry (using unstained cells to set the gate) by BD FACS Canto 2™ and FACD DIVA™ software.

#### Statistical Analysis

Normality distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test with Dallal-Wilkinson-Lilliefors  $p$  value. Non-parametric Kruskal-Wallis test was applied to study the differences between the groups. For *post hoc* correction, Dunn's multiple comparison test was applied. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.). A  $p$  value below 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA).

## RESULTS

### Total Protein Concentration in the Bronchoalveolar Lavage Fluid

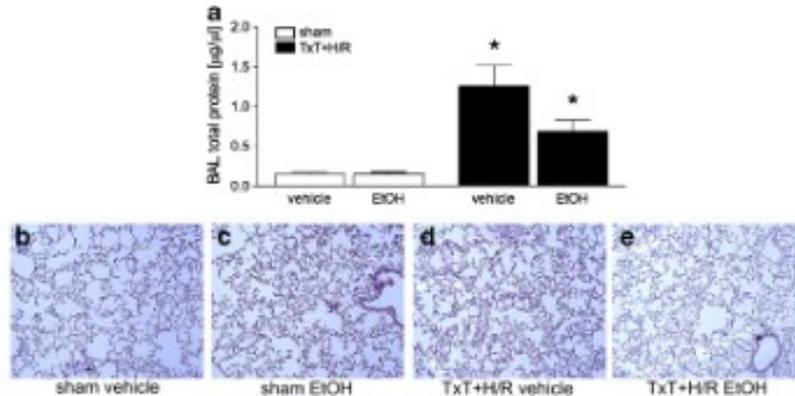
TxT + H/R induced a significant increase in total protein concentration to  $1.26 \pm 0.26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  at 2 h after resuscitation in the vehicle-treated group as compared to sham-operated controls ( $0.14 \pm 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 2a). At 2 h after resuscitation, in the TxT + H/R EtOH group, total protein concentration in the BAL was significantly decreased to  $0.69 \pm 0.14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  compared to the TxT + H/R vehicle group ( $p < 0.05$ , Fig. 2a).

### Histopathological Changes in Lung Tissue

Lung sections from the TxT + H/R vehicle group revealed alveolar disruption with alveolar wall thickening and cellular infiltrates compared to lung morphology of the sham groups (Fig. 2b–d). TxT + H/R-induced changes in the lung morphology were not markedly altered in the TxT + H/R EtOH group (Fig. 2d).

### Lung Neutrophil Accumulation

Local infiltration of the lungs with PMN increased significantly to  $48.82 \pm 2.82$  cells per high-power field at 2 h after resuscitation in the TxT + H/R vehicle group as compared to the sham vehicle group ( $26.68 \pm 1.80$  cells per high-power field,  $p < 0.05$ , Fig. 3a). EtOH markedly diminished lung PMN infiltration after TxT + H/R as compared to the vehicle group after TxT + H/R ( $35.79 \pm 3.18$  vs.  $48.82 \pm 2.82$  cells per high-power field,  $p < 0.05$ , Fig. 3a).



**Fig. 2.** Lung damage after blunt chest trauma (TxT) and hemorrhagic shock followed by resuscitation (H/R). Total protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL, a) and lung tissue damage by hematoxylin-eosin staining (b-e) at 2 h after resuscitation was determined. Sham-operated animals underwent surgical procedures. Vehicle-treated animals received sodium chloride (NaCl, 0.9%) as control, and ethanol (EtOH, alcohol)-treated animals received 5 g/kg, 30% EtOH. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean, \* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ .

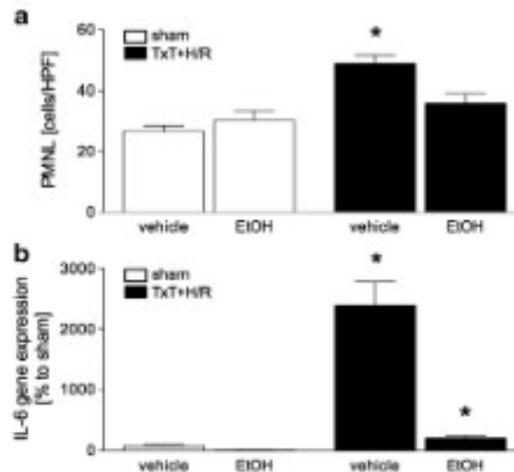
### Interleukin-6 Gene Expression

The local immune response induced by TxT-H/R has been detected at 2 h after resuscitation by significantly increased IL-6 gene expression levels in the TxT-H/R vehicle group compared to the sham vehicle group ( $2393.00 \pm 389.50$  vs.  $78.17 \pm 18.39$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 3b). IL-6 gene expression was significantly reduced by EtOH

after TxT + H/R compared to the TxT-H/R vehicle group ( $p < 0.05$ , Fig. 3b).

### Cell Surface Expression of Intercellular Adhesion Molecules on Granulocytes

To analyze if and how EtOH modulates neutrophil migration after TxT + H/R, expression levels of CD11b,

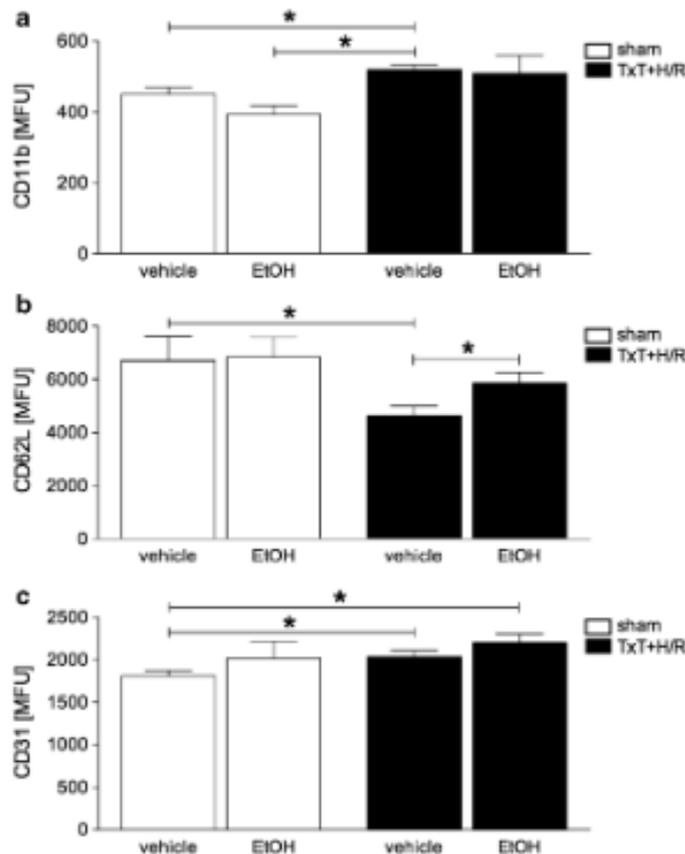


**Fig. 3.** Lung inflammation after blunt chest trauma (TxT) and hemorrhagic shock followed by resuscitation (H/R). Infiltration with polymorphonuclear leukocytes (PMN, a) and systemic interleukin (IL)-6 gene expression (b) at 2 h after resuscitation. Sham-operated animals underwent surgical procedures. Vehicle-treated animals received sodium chloride (NaCl, 0.9%) as control, and ethanol (EtOH, alcohol)-treated animals received 5 g/kg, 30% EtOH. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean, \* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ .

CD62L, and CD31 on granulocytes at 2 h after resuscitation were assessed. TxT + H/R increased significantly CD11b expression on granulocytes in vehicle animals compared to the corresponding sham vehicle group ( $p < 0.05$ , Fig. 4a). Though TxT+H/R induced an increase in CD11b expression in the EtOH group as well, this increase was not significant compared to the sham control groups (Fig. 4a). There was a tendency of decreasing CD11b expression in EtOH-gavaged animals of the sham group compared to sham vehicle group; however, this was not significant.

Regarding CD62L expression, there was no notable difference between the two sham groups. CD62L expression significantly decreased after TxT + H/R in the vehicle group compared to the sham vehicle control ( $p < 0.05$ , Fig. 4b). CD62L expression was significantly increased after TxT + H/R in the EtOH group as compared to the TxT + H/R vehicle group ( $p < 0.05$ , Fig. 4b).

TxT + H/R induced a significant increase of CD31 expression in both vehicle and EtOH group as compared to the sham vehicle control ( $p < 0.05$ , Fig. 4c). Gavage with EtOH further enhanced the CD31 expression both after



**Fig. 4.** Flow cytometric analysis of cellular adhesion molecules CD11b (a), CD62L (b), and CD31 (c) on circulating neutrophils after blunt chest trauma (TxT) and hemorrhagic shock followed by resuscitation (H/R). Flow cytometric analysis was performed 2 h after resuscitation. Sham-operated animals underwent surgical procedures. Vehicle-treated animals received sodium chloride (NaCl, 0.9%) as control, and ethanol (EtOH, alcohol)-treated animals received 5 g/kg, 30% EtOH. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean, \* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ .

sham as well as after TxT + H/R compared to either sham or TxT + H/R vehicle group; however, this difference was not significant ( $p < 0.05$ , Fig. 4c).

#### Monocyte and Granulocyte Apoptosis and Pyroptosis/Inflammasome Activation

To measure monocyte and granulocyte apoptosis and pyroptosis, the activities of caspase-3/7 and caspase-1, respectively, at 2 h after resuscitation have been assessed. Following TxT + H/R, caspase-3/7 activation in the vehicle group was significantly reduced when compared to the corresponding vehicle-treated sham group. Furthermore, EtOH treatment significantly lowered caspase-3/7 expression after TxT + H/R compared with the vehicle group after TxT + H/R (Fig. 5a). In sham groups, there was a clear tendency to decrease caspase-3/7 expression in EtOH-treated compared to vehicle-treated animals; however, this difference was not significant (Fig. 5a).

There were no differences in monocyte apoptosis after TxT + H/R compared to shams or depending on the gavage fluid (Fig. 5b).

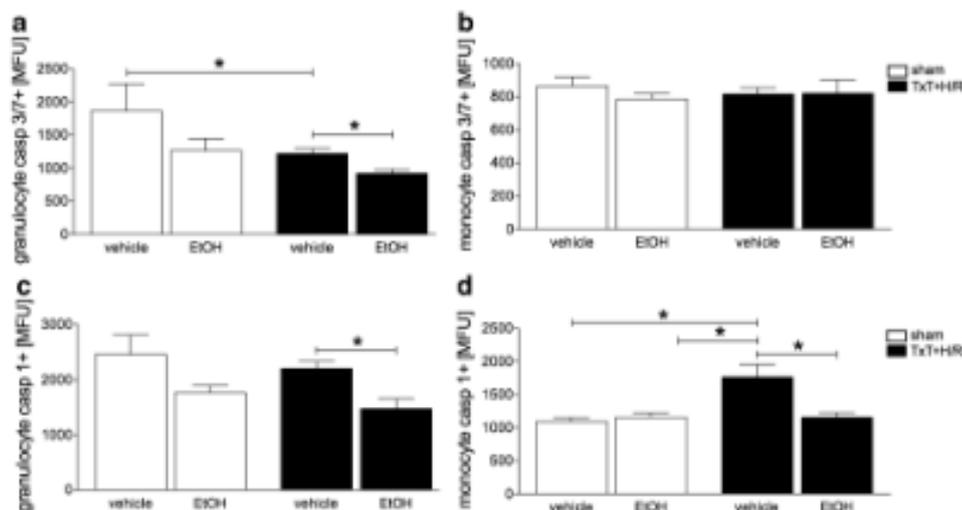
Regarding the pyroptosis, in granulocytes, caspase-1 activity trended to decrease after TxT + H/R and vehicle treatment compared with sham vehicle. Similar data were observed for the EtOH groups (Fig. 5c). EtOH markedly reduced caspase-1 activity in the sham group compared to

vehicle sham control, while this difference was significant between the EtOH and vehicle groups after TxT + H/R in granulocytes (Fig. 5c).

In monocytes, caspase-1 activity was significantly increased after TxT + H/R and vehicle treatment compared to both sham groups ( $p < 0.05$ , Fig. 5d). After TxT + H/R, EtOH significantly decreased the TxT + H/R-induced caspase-1 increase in the vehicle group to the levels which were comparable to those of both sham groups ( $p < 0.05$  Fig. 5d).

#### DISCUSSION

Several studies have described a dose and frequency-dependent influence of alcohol on the immune system. While on the one hand chronic alcohol consumption has been associated with a twofold increased risk of complications, particularly pneumonia and other infections [25], reduced mortality, inflammatory response, and hepatic injury after isolated hemorrhage and resuscitation were found after acute alcohol consumption on the other hand [14]. Thoracic injuries as well as hemorrhagic shock account for significant causes of trauma-related death [2, 4]. Especially lung contusions after blunt chest trauma are related with post-traumatic, inflammation-triggered complications including



**Fig. 5.** Caspase-3/7 (a and b) and caspase-1 (c and d) activation after blunt chest trauma (TxT) and hemorrhagic shock followed by resuscitation (H/R) in granulocytes (a and c) or monocytes (b and d). Granulocytes or monocytes were gated as described in material and methods. Sham-operated animals underwent surgical procedures. Vehicle-treated animals received sodium chloride (NaCl, 0.9%) as control, and ethanol (EtOH, alcohol)-treated animals received 5 g/kg, 30% EtOH. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean, \* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ .

acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [26]. In a clinically relevant double-hit model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock, we examined the modulation of post-traumatic pulmonary as well as systemic inflammatory response by acute alcohol consumption.

Comparable to the observations from small and large *in vivo* models including blunt chest trauma and hemorrhagic shock, in the present study, we found that TxT + H/R induced a profound damage of lung tissue, which has been associated with enhanced local and systemic inflammation [27–29]. Chest trauma itself, as it was observed in porcine as well as in mouse or rat models, led to a mechanic cell damage and severe hemorrhage in lung tissue, observations which were partly found in our model as well, showing edema, wall thickness, and diffuse alveolar damage after trauma [27, 30]. Our results indicated that blunt chest trauma and hemorrhagic shock induced a local cellular histopathological lung damage, findings that were supported by increased pulmonary epithelial leakage, which was monitored by increased protein content in the bronchoalveolar lavage fluid after trauma/hemorrhage. Additionally, the abovementioned studies have described a significant IL-6 and IL-8 increase, of which the first was found in the lung tissue in our model after trauma as well [27, 30]. Inflammatory modulations after trauma/hemorrhage are important components of tissue pathophysiology. Increase of pro-inflammatory mediators has been associated with the infiltration of tissues with neutrophils after trauma/hemorrhage [14, 31]. *In vitro* findings have confirmed IL-6-induced increase in neutrophil adhesion rates to human lung epithelial cells [32]. Interestingly, treatment of human lung epithelial cells with alcohol significantly reduced the IL-6-induced inflammatory response as well as neutrophil adhesion rates to those cells [32]. These findings have been confirmed *in vivo* showing that hemorrhage-induced systemic and local IL-6 increase as well as local tissue infiltration with neutrophils could be diminished by acute exposure to alcohol [14]. Stimulating human lung epithelial cells with either IL-1 $\beta$  or sera from traumatized patients induced a strong release of IL-6 but also an increased adhesion of neutrophils to lung epithelial cells [33]. Similar to the above discussed studies, a consecutive acute exposure to alcohol decreased both effects [33]. The possible molecular mechanism is based on the inflammation-induced activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B [33]. Acute exposure to alcohol reduced significantly p50 activation, which is representing the canonical NF- $\kappa$ B signaling [33]. Interestingly, alcohol did not reduce the activation of p52, which is representing the non-

canonical pathway of NF- $\kappa$ B signaling [33]. Summarized, the anti-inflammatory effects of the acute exposure to alcohol were mediated *via* decreasing nuclear levels of activated p50 subunit involving the canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway [33]. NF- $\kappa$ B is triggering the systemic and local propagation of inflammation [34, 35]. Although we did not evaluate the NF- $\kappa$ B signaling in this study, we have observed significant anti-inflammatory potential of alcohol, which is indicating at its key role in mediating the anti-inflammatory potential of alcohol. This apparently inflammation-suppressing influence of an acute alcohol consumption has been confirmed in the underlying study as well. Although the previously observed tissue-protective and anti-inflammatory effects of alcohol under acute inflammatory conditions were not obvious according to the lung morphology, the reduced protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid does imply beneficial inflammation-suppressive effects in our model. However, further studies with special regard to organ function and underlying mechanisms are clearly required.

Neutrophils play a pivotal role in the initiation and propagation of the inflammatory response to trauma [36]. Traumatic injury leads to marked alterations in the neutrophil phenotype, their function, and life span. Comparable to our data, the cell surface expression of CD62L, a receptor that facilitates tethering of neutrophils to the endothelium, has been shown to be significantly reduced on systemically circulating neutrophils after trauma [37, 38]. However, this was observed 6 h, 9 h, and 24 h after trauma. Interestingly, in traumatized patients, CD62L has also been reported to increase within a short observational period of 2.5 h (mean sample time = 1.2 h, median = 1 h) after trauma [39]. During neutrophil activation and migration, CD62L is shed from the cell into the circulation as soluble L-selectin [40]. It remains to be elucidated in further studies, when CD62L is shed in mice after blunt chest trauma and hemorrhagic shock and if alcohol suppresses or only postpones this process.

Interestingly, in line with previously reported data, our findings indicate as well that the surface expression of CD31 and CD11b, which forms part of the heterodimeric integrin Mac-1, that is responsible for mediating the firm adhesion to the endothelium is significantly increased after trauma [41]. Together, according to Hazeldine *et al.*, the combined data for CD62L decrease and the CD11b increase suggest that systemic activation of the circulating neutrophil occurs following trauma [36]. Coherent with the systemic neutrophil activation, local inflammation as shown by, *e.g.*, increased IL-6, may explain the significant rise in PMNL migration to lung tissue after blunt chest

trauma and hemorrhagic shock, which has been observed in the underlying study. Additionally, as CD62L shedding is seen as a protective mechanism against excessive inflammation [42], the decreased CD62L shedding as a consequence of an acute alcohol consumption may indicate at a reduced systemic activation of neutrophils and subsequently their lower infiltration rates in the lungs. Together, these processes may end up in an improved barrier function as shown by less protein leakage into the bronchoalveolar lavage fluid upon alcohol consumption and blunt chest trauma followed by hemorrhagic shock. Nonetheless, these hypotheses remain to be elucidated in further studies.

Next to their phenotype alterations, trauma induces functional modulations of neutrophils such as of their increased life-span, which is caused by lowered apoptosis rates [41]. After blunt chest trauma followed by hemorrhagic shock, we observed a significant reduction in neutrophil apoptosis, demonstrated by decreased caspase-3/7 activation. Interestingly, Shults *et al.* have shown that excessive pulmonary inflammation, which was paralleled by decreased lung function, is mediated in part by alveolar macrophages [43]. In their burn trauma model, they have postulated that the restoration of lung tissue homeostasis was dependent on the eradication of neutrophils and removal of apoptotic cells, which are major functions of alveolar macrophages [43]. They uncovered that the loss of alveolar macrophages paralleled a strong increase in lung cell death and found that alcohol consumption delayed the resolution of the necessary inflammation [43]. Our study seems to substantiate their postulation, as we see a significantly lowered caspase-3/7 activity after EtOH treatment in the TxT + H/R groups and a likewise clear tendency in the sham groups. However, besides a small trend of decreased caspase-3/7 activity after EtOH treatment in the sham groups, there were no significant alterations in monocyte apoptosis after TxT + H/R or acute alcohol consumption. Next to apoptotic modulations, inflammation-induced apoptosis, so-called pyroptosis or inflammasome activation, is recently gaining more interest. As immunosuppression is a major complication of alcoholism, the caspase-1 activation indicating inflammasome activity has been evaluated [44]. Inflammasomes are cytosolic multi-protein complexes, which are of central importance for inflammatory processes by promoting the maturation of certain pro-inflammatory cytokines notably IL-1 $\beta$  or IL-18 [45]. A typical multimeric inflammasome consists of an adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (CARD), abbreviated ASC, the zymogen pro-caspase-1, and a cytosolic pattern recognition receptor

(PRR), which is capable of detecting intracellular PAMP related to infectious pathogens and/or DAMP related to cell stress [46]. Upon PRR stimulation, inflammasome assembly is mediated by the PYD/PYD interaction between ASC and a cytosolic PRR and a CARD/CARD interaction between ASC and pro-caspase-1 resulting into ASC-formed cytosolic specks [47]. This so-called speck formation promotes the auto-activation of inactive pro-caspase-1 into its active form caspase-1 [47, 48]. Then, active caspase-1 proteolytically cleaves the precursor of, e.g., IL-1 $\beta$  into its mature, secreted active form [47, 49]. Caspase-1 is the leading enzyme which mediates pyroptosis, a highly inflammatory form of programmed cell death [46, 50]. Though TxT + H/R did not modulate the inflammasome activation, alcohol reduced strongly the pro-inflammatory activity of neutrophils. Apparently, this is a general effect on inflammasome activation in neutrophils, since comparable data have been observed in both sham and trauma animals. Recently, Hoyt *et al.* have shown that in a mouse macrophage cell line, mouse bone marrow-derived dendritic cells, mouse neutrophils, and human peripheral blood mononuclear cells, ethanol and other short-chain alcohols inhibited inflammasome activation [51]. Upon TxT + H/R, increased inflammasome activation has been shown in monocytes, and in line with the above reports, alcohol intoxication reduced markedly the caspase-1 activity.

Other neutrophilic functions are modified by alcohol as well. It has been shown that the phagocytic and oxidative burst capacity of polymorphonuclear cells was suppressed in alcohol-intoxicated rodents after hemorrhagic shock [52]. Similarly, the ability of neutrophils to phagocytose virulent K2 *Klebsiella pneumoniae* was suppressed by ethanol at high concentrations [53]. This finding may account for the higher prevalence of pneumonia or other extrapulmonary infection in people with acute alcohol intoxication. If possible alterations in phagocytic and oxidative burst capacity of neutrophils are suppressed by alcohol in this model remains to be elucidated in further studies. However, the above described activation of neutrophils after blunt chest trauma followed by hemorrhagic shock, which was reduced by acute alcohol consumption, may indicate at a reduced systemic activation of neutrophils and subsequently less infiltration of the lungs with these cells. Similar data were reported by Oh and Diamond, who studied the effects of alcohol at physiological concentrations on neutrophil membrane tether pulling, adhesion lifetime, rolling, and firm arrest behavior in parallel-plate flow chamber assays with P-selectin-coated beads, P-selectin-coated surfaces, or IL-1-stimulated human

endothelium [54]. They found that alcohol reduced rolling velocity and rolling flux on P-selectin surfaces compared with untreated neutrophils. On IL-1-stimulated endothelium, rolling velocity was unchanged by alcohol treatment, but the fraction of cells converting to firm arrest was reduced [54]. Overall, this data indicate that alcohol directly influences neutrophil adhesion rates as demonstrated in our study as well.

Taken together, we hypothesize that increased systemic activation of neutrophils and monocytes after blunt chest trauma and hemorrhagic shock is associated with enhanced local inflammation and reduced neutrophil apoptosis, which are associated with tissue damage. Acute alcohol consumption inhibits systemic activation of neutrophils, possibly via NF- $\kappa$ B signaling, thereby reducing neutrophil infiltration rates into the lungs, an effect that subsequently contributes to decreased local pulmonary inflammation and improved barrier function after blunt chest trauma and hemorrhagic shock.

There are several limitations of our study. The control group was not fed with isocaloric diet but instead received a sodium chloride solution, which is well-accepted as control solution; however, an isocaloric diet should be included in future studies. We have applied only one dose of ethanol, which may not allow for any dose dependency analyses, which are apparently indicated in the clinical scenario. Similarly, the impact of ethanol's toxic metabolites was not studied and remains to be elaborated in further studies. In conclusion, the severity of the tissue damage may be dependent on the timing of alcohol intoxication, but also in the trauma severity itself. Additionally, we have investigated only one point in time and did not perform kinetics. Also, the impact of ethanol on apoptosis of leukocytes, NF- $\kappa$ B signaling pathway, and its relevance for tissue damage remain to be further evaluated in future studies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katrin Jurida, Kerstin Konradowitz, and Alexander Schaible for outstanding technical assistance.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR and MP designed the study and obtained the grant. NF, NW, and SD performed the experiments. NF, BR, and NW performed the statistical analysis and wrote the manuscript. KK evaluated the histology. KM, RS, and IM made important intellectual contributions to the study and revised the manuscript.

#### FUNDING

This study was supported by grants from DFG RE 3304/5-1 and DFG PE 908/3-1.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Ethical Approval.** Animal protocols were approved by the Veterinary Department of the Regional Council in Darmstadt, Germany.

**Conflict of Interest.** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Abbreviations:** APC, Allophycocyanine; ARDS, Acute respiratory distress syndrome; ASC, Apoptosis-associated speck-like protein containing; BAL, Bronchoalveolar lavage fluid; CAE, Chloroacetate esterase; CARD, Caspase activation and recruitment domain; CD, Cluster of differentiation; CT, Comparative threshold-cycle; DAMP, Damage-associated molecular pattern; DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, German Research Foundation; EtOH, Ethanol; Fig., Figure; FITC, Fluorescein isothiocyanate; *g*, Earth's gravitational acceleration; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H/E, Hematoxylin-eosin; Hg, Mercury; HS, Hemorrhagic shock; IL, Interleukin; LPS, Lipopolysaccharide; MABP, Mean arterial blood pressure; MFU, Mean fluorescence units; MOF, Multiple organ failure; MODS, Multiple organ dysfunction syndrome; NaCl, Sodium chloride; NF- $\kappa$ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; *p*, *P* value; PAMP, Pathogen-associated molecular pattern; PRR, Pattern recognition receptor; PMN, Polymorphonuclear leukocyte; R, Resuscitation; RNA, Ribonucleic acid; RT, Room temperature; qRT-PCR, Semi-quantitative real-time polymerase chain reaction; s.e.m., Standard error of the mean; TxT, Blunt thoracic/chest trauma; U, Unit

#### REFERENCES

1. Sakran, J.V., S.E. Groer, E. Werlin, and M. McCum. 2012. Care of the injured worldwide: Trauma still the neglected disease of modern society. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 20: 64.
2. Esmer, E., P. Derst, R. Lefering, M. Schulz, H. Siekmann, K.S. Delank, and das TraumaRegister DGU. 2017. Prehospital assessment of injury type and severity in severely injured patients by

- emergency physicians: An analysis of the TraumaRegister DGU(R). *Der Unfallchirurg* 120: 409–416.
3. Spahn, D.R., B. Bouillon, V. Cerny, T.J. Coats, J. Duranteau, E. Fernandez-Mondejar, D. Filipescu, B.J. Hunt, R. Komadina, G. Nardi, F. Neugebauer, Y. Ozier, L. Riddez, A. Schultz, J.L. Vincent, and R. Rossaint. 2013. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: An updated European guideline. *Critical Care* 17: R76.
  4. Dutton, R.P., L.G. Stansbury, S. Leone, E. Kramer, J.R. Hoss, and T.M. Scalea. 2010. Trauma mortality in mature trauma systems: Are we doing better? An analysis of trauma mortality patterns, 1997–2008. *The Journal of Trauma* 69: 620–626.
  5. Raymond, S.L., D.C. Holden, J.C. Mira, J.A. Stortz, T.J. Loftus, A.M. Mohr, L.L. Moldawer, F.A. Moore, S.D. Larson, and P.A. Efron. 2017. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863: 2564–2573.
  6. Bruns, B., T. Humle, P. Kellermann, A. Ayala, and M. Perl. 2017. Divergent effects of neutrophils on Fas-induced pulmonary inflammation, apoptosis, and lung damage. *Shock* 47: 225–235.
  7. Ware, L.B., and M.A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 342: 1334–1349.
  8. Chiu, C.F., C.H. Chiang, C. Yuen-Jung, C.H. Chung, S.L. Liu, J. Yi-Hsin, H. Zhang, and J.H. Ryu. 2012. Apocynin attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock* 38: 196–202.
  9. Relja, B., R. Taraki, M.P. Teuben, K. Mors, N. Wagner, S. Wutzler, F. Hildebrand, M. Perl, and I. Marzi. 2016. Sera from severe trauma patients with pneumonia and without infectious complications have differential effects on neutrophil biology. *BMC Pulmonary Medicine* 16: 171.
  10. Wedepohl, S., F. Becker-Braun, S. Riese, K. Buscher, S. Enders, G. Bernhard, K. Kilian, V. Blanchard, J. Demedde, and R. Tauber. 2012. L-selectin—a dynamic regulator of leukocyte migration. *European Journal of Cell Biology* 91: 257–264.
  11. Hoff, J.J., J.D. Wells, E.M. Hiltbold, C.F. McCall, and B.K. Yozz. 2011. Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion. *Shock* 35: 604–609.
  12. Mantz-Bello, G., W.C. Liles, F. Radella 2nd, K.P. Steinberg, J.T. Ruzinski, L.D. Hudson, and T.R. Martin. 2000. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine* 28: 1–7.
  13. Weckbach, S., C. Hohmann, S. Braumüller, S. Denk, B. Klohs, P.F. Stahel, F. Gebhard, M.S. Huber-Lang, and M. Perl. 2013. Inflammatory and apoptotic alterations in serum and injured tissue after experimental polytrauma in mice: distinct early response compared with single traumas or “double-hit” injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 74: 489–498.
  14. Relja, B., C. Hohn, F. Bormann, K. Seyboth, D. Henrich, I. Marzi, and M. Lehnert. 2012. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *British Journal of Pharmacology* 165: 1188–1199.
  15. Relja, B., J. Menke, N. Wagner, B. Auner, M. Voth, C. Nau, and I. Marzi. 2016. Effects of positive blood alcohol concentration on outcome and systemic interleukin-6 in major trauma patients. *Injury* 47: 640–645.
  16. Bae, D.M., S. Nelson, P. Zhang, L. Quinton, and G.J. Bagby. 2003. Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the
  17. Patel, M., A. Keshavarzian, V. Kottapalli, B. Badic, D. Winship, and J.Z. Fields. 1996. Human neutrophil functions are inhibited in vitro by clinically relevant ethanol concentrations. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 20: 275–283.
  18. Kilkenny, C., W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, and D.G. Altman. 2010. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology* 8: e1000412.
  19. Wagner, N., N. Franz, S. Dieteren, M. Perl, K. Mors, I. Marzi, and B. Relja. 2017. Acute alcohol binge deteriorates metabolic and respiratory compensation capability after blunt chest trauma followed by hemorrhagic shock - a new research model. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 41: 1559–1567.
  20. Weckbach, S., M. Perl, T. Heiland, S. Braumüller, P.F. Stahel, M.A. Flierl, A. Ignatius, F. Gebhard, and M. Huber-Lang. 2012. A new experimental polytrauma model in rats: Molecular characterization of the early inflammatory response. *Mediators of Inflammation* 2012: 890816.
  21. Wagner, N., S. Dieteren, N. Franz, K. Köhler, K. Mors, L. Nicia, J. Schmidt, M. Perl, I. Marzi, and B. Relja. 2018. Ethyl pyruvate ameliorates hepatic injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock by reducing local inflammation, NF-kappaB activation and HMGB1 release. *PLoS One* 13: e0192171.
  22. Relja, B., N. Wagner, N. Franz, S. Dieteren, K. Mors, J. Schmidt, I. Marzi, and M. Perl. 2018. Ethyl pyruvate reduces acute lung damage following trauma and hemorrhagic shock via inhibition of NF-kappaB and HMGB1. *Immunobiology* 223: 310–318.
  23. Relja, B., E. Tittel, L. Breig, D. Henrich, H. Schneider, I. Marzi, and M. Lehnert. 2011. Effects of green tea catechins on the pro-inflammatory response after haemorrhage/resuscitation in rats. *The British Journal of Nutrition* 105: 1791–1797.
  24. Relja, B., J.P. Horstmann, K. Konradowitz, K. Jurida, A. Schable, C. Neunaber, E. Oppermann, and I. Marzi. 2015. Nlrp1 inflammasome is downregulated in trauma patients. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)* 93: 1391–1400.
  25. Bird, M.D., M.A. Choudhry, P.F. Molina, and F.J. Kovacs. 2009. Alcohol and trauma: A summary of the satellite symposium at the 30th annual meeting of the Shock Society. *Alcohol* 43: 247–252.
  26. Veysi, V.T., V.S. Nikolaou, C. Paliobeis, N. Efsthopoulos, and P.V. Giannoudis. 2009. Prevalence of chest trauma, associated injuries and mortality: A level I trauma centre experience. *International Orthopaedics* 33: 1425–1433.
  27. Horst, K., T.P. Simon, R. Pfeifer, M. Teuben, K. Almalmond, Q. Zhi, S.A. Santos, C.C. Wemmers, S. Leonhardt, N. Heussen, P. Stormann, B. Auner, B. Relja, I. Marzi, A.T. Haug, M. van Griensven, M. Kalbitz, M. Huber-Lang, R. Tolba, L.K. Reiss, S. Uhlig, G. Marx, H.C. Pape, and F. Hildebrand. 2016. Characterization of blunt chest traumas in a long-term porcine model of severe multiple trauma. *Scientific Reports* 6: 39659.
  28. Seitz, D.H., M. Perl, U.C. Liener, B. Tauchmann, S.T. Braumüller, U.B. Brückner, F. Gebhard, and M.W. Knofel. 2011. Inflammatory alterations in a novel combination model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *The Journal of Trauma* 70: 189–196.
  29. Wu, X.J., H.M. Liu, X.M. Song, B. Zhao, Y. Leng, F.Y. Wang, L.Y. Zhao, Q.T. Meng, and Z.Y. Xia. 2018. Penicillamine hydrochloride inhibits TLR4 signaling and inflammation, and attenuates blunt chest trauma and hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats. *Molecular Medicine Reports* 17: 6327–6336.
  30. Knofel, M.W., U.C. Liener, D.H. Seitz, M. Perl, U.B. Brückner, L. Kind, and F. Gebhard. 2003. Cardiopulmonary, histological, and

31. Denk, S., S. Weckbach, P. Eisele, C.K. Braun, R. Wiegner, J.J. Ohmann, L. Wirtz, F.M. Hoenes, P. Kellermann, P. Radermacher, U. Wächter, S. Hafner, O. McCook, A. Schultze, A. Palmer, S. Braumüller, F. Gebhard, and M. Huber-Lang. 2018. Role of hemorrhagic shock in experimental polytrauma. *Shock* 49(2):154-163. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000925>.
32. Relja, B., N. Omid, A. Schauble, M. Perl, S. Meier, E. Oppermann, M. Lehner, and I. Marzi. 2015. Pre- or post-treatment with ethanol and ethyl pyruvate results in distinct anti-inflammatory responses of human lung epithelial cells triggered by interleukin-6. *Molecular Medicine Reports* 12: 2991-2998.
33. Mors, K., J.A. Horan, S. Kany, N. Wagner, R. Sturm, M. Woschek, M. Perl, I. Marzi, and B. Relja. 2017. Ethanol decreases inflammatory response in human lung epithelial cells by inhibiting the canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* 43: 17-30.
34. Mandrekar, P., D. Catalano, and G. Szabo. 1997. Alcohol-induced regulation of nuclear regulatory factor-kappa beta in human monocytes. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 21: 988-994.
35. Mandrekar, P., D. Catalano, B. White, and G. Szabo. 2006. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: Inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 30: 135-139.
36. Hazeldine, J., P. Hampson, and J.M. Lord. 2014. The impact of trauma on neutrophil function. *Injury* 45: 1824-1833.
37. Groeneveld, K.M., F. Hietbrink, T.C. Hardcastle, B.L. Warren, L. Koenderman, and L.P. Leenen. 2014. Penetrating thorax injury leads to mild systemic activation of neutrophils without inflammatory complications. *Injury* 45: 522-527.
38. Visser, T., F. Hietbrink, K.M. Groeneveld, L. Koenderman, and L.P. Leenen. 2011. Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* 37: 177-184.
39. Cocks, R.A., and T.Y. Chan. 1997. Alteration in leukocyte adhesion molecule expression following minor, moderate and major trauma. *European Journal of Emergency Medicine* 4: 193-195.
40. Jutila, M.A., L. Rott, E.L. Berg, and E.C. Butcher. 1989. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: Comparison with LFA-1 and MAC-1. *Journal of Immunology* 143: 3318-3324.
41. Junger, W.G., S.G. Rhind, S.B. Rizoli, J. Cuschieri, A.J. Baker, P.N. Slick, D.B. Hoyt, and F.M. Bulger. 2013. Prehospital hypertonic saline resuscitation attenuates the activation and promotes apoptosis of neutrophils in patients with severe traumatic brain injury. *Shock* 40: 366-374.
42. Mommson, P., T. Barkhausen, F. Hildebrand, C. Zechey, C. Krettek, and M. van Griensven. 2011. Regulation of L-selectin expression by trauma-relevant cytokines. *Pathology, Research and Practice* 207: 142-147.
43. Shults, J.A., B.J. Curtis, D.M. Boe, L. Ramirez, and E.J. Kovacs. 2016. Ethanol intoxication prolongs post-burn pulmonary inflammation: Role of alveolar macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 100: 1037-1045.
44. O'Brien, M., D. Moehring, R. Munoz-Planillo, G. Nunez, J. Callaway, J. Ting, M. Scaria, T. Ugo, L. Bernad, J. Cali, and D. Luzzo. 2017. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *Journal of Immunological Methods* 447: 1-13.
45. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp. 2002. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell* 10: 417-426.
46. Awad, F., E. Assawi, C. Louvriat, C. Jumeau, S. Georgin-Lavielle, G. Grateau, S. Amselem, I. Giurgea, and S.A. Karabina. 2018. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics* 187:133-149. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.011>.
47. Place, D.E., and T.D. Kanneganti. 2017. Recent advances in inflammasome biology. *Current Opinion in Immunology* 50: 32-38.
48. Elliott, J.M., I. Rouge, C. Wisnmann, and J.M. Scherz. 2009. Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 6546-6553.
49. Thornberry, N.A., H.G. Bull, J.R. Cabry, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineteaux, J.R. Weidner, J. Amins, K.O. Eilston, J.M. Ayala, F.J. Casano, J. Chin, G.J.F. Ding, L.A. Egger, E.P. Gaffney, G. Lianjaco, O.C. Palyha, S.M. Raju, A.M. Rolando, J.P. Salley, T.T. Yamin, T.D. Lee, J.E. Shively, M. MacCross, R.A. Mumford, J.A. Schmidt, and M.J. Tocci. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356: 768-774.
50. Breznan, M.A., and B.T. Cookson. 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology* 38: 31-40.
51. Hoyt, L.R., J.L. Ather, M.J. Randall, D.P. DePuccio, C.C. Landry, M.D. Wewers, M.A. Gervolin, and M.E. Poynter. 2016. Ethanol and other short-chain alcohols inhibit NLRP3 inflammasome activation through protein tyrosine phosphatase stimulation. *Journal of Immunology* 197: 1322-1334.
52. Molina, P.E., K.L. Zambell, K. Norenberg, J. Eason, H. Phelan, P. Zhang, C.V. Stouwe, J.W. Carnal, and C. Porreca. 2004. Consequences of alcohol-induced early dysregulation of responses to trauma/hemorrhage. *Alcohol* 33: 217-227.
53. Chiu, C.H., Y.C. Wang, K.M. Yeh, J.C. Lin, L.K. Siu, and F.Y. Chang. 2018. Influence of ethanol concentration in the phagocytic function of neutrophils against *Klebsiella pneumoniae* isolates in an experimental model. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 51: 64-69.
54. Oh, H., and S.L. Diamond. 2008. Ethanol enhances neutrophil membrane tether growth and slows rolling on P-selectin but reduces capture from flow and firm arrest on IL-1-treated endothelium. *Journal of Immunology* 181: 2472-2482.

# Acute Alcohol Binge Deteriorates Metabolic and Respiratory Compensation Capability After Blunt Chest Trauma Followed by Hemorrhagic Shock—A New Research Model

Nils Wagner , Niklas Franz, Scott Dieteren, Mario Perl, Katharina Mörs, Ingo Marzi, and Borna Relja

**Background:** The clinical relevance of blunt (thoracic) chest trauma (TxT) and hemorrhagic shock is indisputable due to the high prevalence of this injury type, as well as its close association with mortality and/or preventable deaths. Furthermore, there is an ongoing discussion about the influence of alcohol in trauma patients. Thus, we established a model of TxT followed by hemorrhagic shock with resuscitation (H/R) in alcohol-intoxicated rats.

**Methods:** Depending on group allocation, 12 (subacute) or 2 (acute) hours before experimentation, the animals received a single oral dose of alcohol (ethanol [EtOH]) or saline (NaCl) followed by TxT, hemorrhagic shock ( $35 \pm 3$  mm Hg), and resuscitation (TxT + H/R). Arterial blood gas analyses and continuous monitoring of blood pressure were performed during the experimentation period. Survival during the experimentation procedure was determined.

**Results:** Subacute and acute EtOH group exhibited lower baseline mean arterial blood pressure values compared with the corresponding NaCl group, respectively. Both EtOH groups showed lower maximal bleed-out volume, which was necessary to induce hemorrhagic shock compared to NaCl groups, and the recovery during the resuscitation period was attenuated. During the experimentation in all groups, a trend to acidic pH was observed. Acute EtOH group showed lowest pH values compared to all other groups. Higher  $p\text{CO}_2$  values were observed in both EtOH groups. All groups developed negative base excess and decreasing  $\text{HCO}_3^-$  values until the end of hemorrhagic shock and showed increasing base excess and  $\text{HCO}_3^-$  values during resuscitation. Significantly higher mortality rate was found in the acute EtOH group.

**Conclusions:** This study indicates that alcohol limits the metabolic and respiratory compensation capability, thereby promoting mortality.

**Key Words:** Alcohol, Binge, Acidosis, Respiratory, Metabolic, Blood Gas Analyses.

**I**N 2014, 22,717 patients have died after an accident in Germany (Statistisches Bundesamt, 2014c), with statistics also showing that trauma is one of the major causes of mortality worldwide (Sakran et al., 2012). Notably multiple trauma injuries, including traumatic brain injuries (47%) and/or chest trauma (46%) as well as hemorrhagic shock, contribute to patient's mortality, indicating the important role these injury patterns play in the outcome (Esmier et al., 2017; Spahn et al., 2013). In fact, the most preventable cause

of death is the uncontrolled bleeding/hemorrhagic shock (Spahn et al., 2013).

In 2014 as well, 14,099 patients died due to alcohol-induced diseases (Statistisches Bundesamt, 2014a), while 22,391 patients were in need of in-hospital treatment due to alcohol use/abuse (Statistisches Bundesamt, 2014b). The relevance of alcohol intoxication for accidents is part of the clinical reality. There is an ongoing discussion about the influence of alcohol in trauma patients. Numerous studies have shown negative as well as positive impact of alcohol in the experimental setting of acute inflammation due to trauma, or in trauma patients themselves (Lustenberger et al., 2011; Relja et al., 2016; Ristic et al., 2013; Scheyerer et al., 2014; Stubig et al., 2012; Wagner et al., 2016). Importantly, these studies consistently indicate the deleterious effects of prolonged or excessive alcohol use, while its use either in moderate dose or acute settings delivered conflictive data (Jurkovich et al., 1993; Lustenberger et al., 2011; Relja et al., 2012a,b, 2013; Vasdev et al., 2006). Summarized, these findings reflect the evident need for further research regarding alcohol and trauma. Importantly, due to ethical reasons,

From the Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery (NW, NF, SD, KM, IM, BR), University Hospital Frankfurt, Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany; and BG-Trauma Center Murnau (MP), Murnau, Germany.

Received for publication February 14, 2017; accepted July 7, 2017.

Reprint requests: Nils Wagner, Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Hospitals of the Goethe-University Frankfurt am Main, 60590 Frankfurt, Germany. Tel.: +49 69 6301 5069; Fax: +49 69 6301 84375; E-mail: nils.wagner@kgu.de

Copyright © 2017 by the Research Society on Alcoholism.

DOI: 10.1111/acer.13446

Alcohol Clin Exp Res, Vol 41, No 9, 2017; pp 1559–1567

1559



prospective studies can only be realized using *in vivo* models. Several animal models address trauma questions (Hildebrand et al., 2012; Rixen et al., 2001; Robinson et al., 2017), combining chest trauma and hemorrhagic shock (Prunet et al., 2016; Seitz et al., 2011) as well as long-term outcome (Alam et al., 2011; Robinson et al., 2017; Webster et al., 2015). However, none of these models reflects the intrinsic difficulties in studying the large number of alcohol-intoxicated patients with respect to the timing of the alcohol use, and the predominant trauma injury mechanism of combined blunt chest trauma (TxT) with hemorrhagic shock.

Thus, we have established a model of TxT followed by hemorrhagic shock with resuscitation (H/R) in alcohol-intoxicated rats. Using this model, we aimed for mimicking the clinically realistic scenario to evaluate the physiologic state of the animal and the experimental procedures, as well as the resuscitation protocol with elaboration of mortality rates.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The study was approved by the Veterinary Department of the Regional Council in Darmstadt, Germany. Based on our previous studies, female LEWIS rats (190 to 240 g; Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, France) were used. Acclimation of the animals was ensured for at least 7 days. Depending on group allocation 12 (subacute) or 2 (acute) hours before experimentation, the animals received a single dose of ethanol (5 g/kg, 30% EtOH) or control sodium chloride solution (NaCl 0.9%) via oral gavage. Our previous studies have shown that 5 g/kg EtOH, given subacutely before the experimentation, induced an acute "fatty-like" liver (Relja et al., 2012b, 2013). In previous studies, using a concentration of 20% of EtOH substantially increased the risk of aspiration due to high gavage volume, and therefore, we have increased its concentration to 30%. Using this concentration, no aspiration was observed and hepatic fat accumulation and hepatic damage after both sham and H/R procedure were comparable (data not shown; Kozan et al., 2009). As the aim of the study was to establish a clinically relevant model, additional groups with an oral gavage 2 hours prior experimentation have been included in the study design to mimic the clinical "drink and drive" scenario.

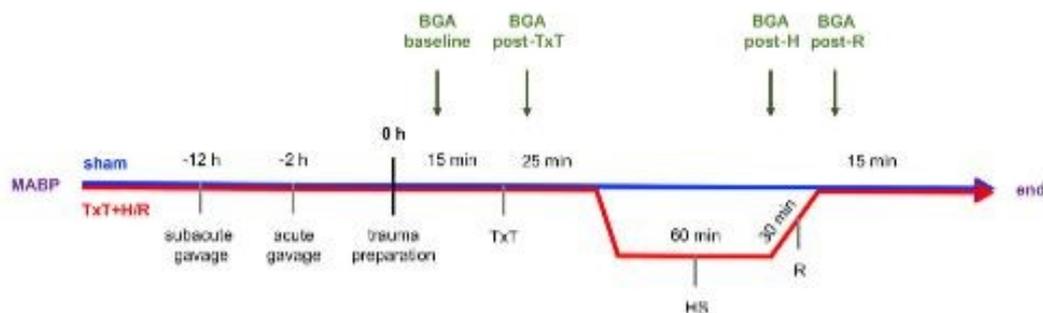
### Animal Preparation

Thirty minutes prior to experimentation, the animals received buprenorphine (0.05 mg/kg body weight). Anesthesia was performed by mask anesthesia with isoflurane (1.2 to 3.0%) oxygen mixture. Abdomen, chest, right inguinal, and the neck regions were shaved. The incision sites were infiltrated with 0.25% Carbostesin. The right femoral artery was cannulated with polyethylene tubing for blood pressure monitoring, and thereafter, the first blood withdrawal for blood gas analysis was performed (baseline).

### Induction of Blunt Chest Trauma

Bilateral TxT was performed as described in previous studies (Liener et al., 2003; Seitz et al., 2008). In brief, rats were placed in a supine position. A cylinder separated by a Mylar polyester film (0.190 mm; DuPont Teijin Films, Luxembourg) was placed 6 cm above the ventral thorax of the animal. Using compressed air, the polyester membrane was perforated, and a standardized blast wave was guided to the thorax of the animal. Immediately after TxT, blood pressure was measured via the femoral artery. After a short stabilization period of 2 minutes, the left jugular vein and the right carotid artery were cannulated with polyethylene tubing. Then, blood was withdrawn for second blood gas analyses (post-TxT).

**Induction of Hemorrhagic Shock.** Henceforward, isoflurane anesthesia was conducted under room air concentration. Hemorrhagic shock was performed as described in previous studies (Lehner et al., 2008; Relja et al., 2009). Briefly, hemorrhagic shock was initiated during 5 minutes by withdrawing blood from the right artery into a heparinized syringe until a mean arterial blood pressure (MABP) was reduced to  $35 \pm 3$  mm Hg. Systemic blood pressure was monitored via the right femoral artery using a blood pressure analyzer (Siemens AG, München, Germany). Constant pressure was ensured by further withdrawal or injection of small volumes of blood for 60 minutes. At the end of the hemorrhagic shock period, the third blood gas analysis was performed (post-H). Afterward, anesthesia was changed back to initial concentration. Resuscitation was performed by transfusing 60% of the shed blood, plus 50% volume of the maximal shed blood volume as lactated Ringer's solution via the left jugular vein. At the end of the resuscitation period, the last blood gas analysis was conducted (post-R). The catheters were then removed, the vessels were occluded, and the wounds were closed. Figure 1 shows an overview about the experimentation process (Fig. 1).



**Fig. 1.** Schematic timeline of the experimental design. Acute gavage: Either EtOH or NaCl was gavaged 2 hours before beginning of trauma preparation, BGA: blood gas analysis, HS: hemorrhagic shock, MABP: mean arterial blood pressure, R: resuscitation; subacute gavage: Either EtOH or NaCl were gavaged 12 hours before beginning of trauma preparation, TxT: blunt chest trauma. Sham group underwent all surgical procedures without induction of TxT + H/R.

**Table 1.** Groups Overview

Group	Characteristics	Number
1	Sham, sub acute NaCl gavage	n = 6
2	Sham, acute NaCl gavage	n = 6
3	Sham, sub acute EtOH gavage	n = 6
4	Sham, acute EtOH gavage	n = 6
5	TxT + H/R, sub acute NaCl gavage	n = 8
6	TxT + H/R, acute NaCl gavage	n = 8
7	TxT + H/R, sub acute EtOH gavage	n = 9
8	TxT + H/R, acute EtOH gavage	n = 20

The animals received either ethanol (EtOH) or NaCl 2 (acute) or 12 hours (subacute) before the beginning of the experiments. Sham group underwent all surgical procedures without induction of TxT + H/R.

**Group Allocation.** Animals were randomly subdivided into 8 groups (Table 1). The sham groups received either EtOH or NaCl (2 hours, acute or 12 hours, subacute) before the beginning of the experiments, and underwent all surgical procedures without induction of TxT or H/R.

**Monitoring and Blood Gas Analyses.** During the entire experimentation period, blood pressure and temperature were continuously monitored. At the end, the animals received free access to water and food. Arterial blood gas analyses were performed before the onset of TxT (baseline), after TxT (post-TxT), after hemorrhagic shock (post-H), and after the completion of resuscitation (post-R). pH value, pCO<sub>2</sub> (mm Hg), pO<sub>2</sub> (mm Hg), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/l), sO<sub>2</sub> (%), lactate (mg/dl), base excess (mmol/l), and hemoglobin (Hb) were determined (GEM Premier 4000, BGA Set Optomedical Comfort Sampler Basic Kit; Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Germany).

**Alcohol Determination.** After cannulation of the right femoral artery, a blood sample for the determination of the blood alcohol concentration (BAC) was taken. Blood samples were obtained in prechilled ethylenediaminetetraacetic acid tubes (BD vacutainer; Becton Dickinson Diagnostics, Aalst, Belgium) and kept on ice. Blood was centrifuged at 2,000×g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was used for the determination of BAC using the diagnostic set serum EtOH by Cobas 8000 Modular Analyzer (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany).

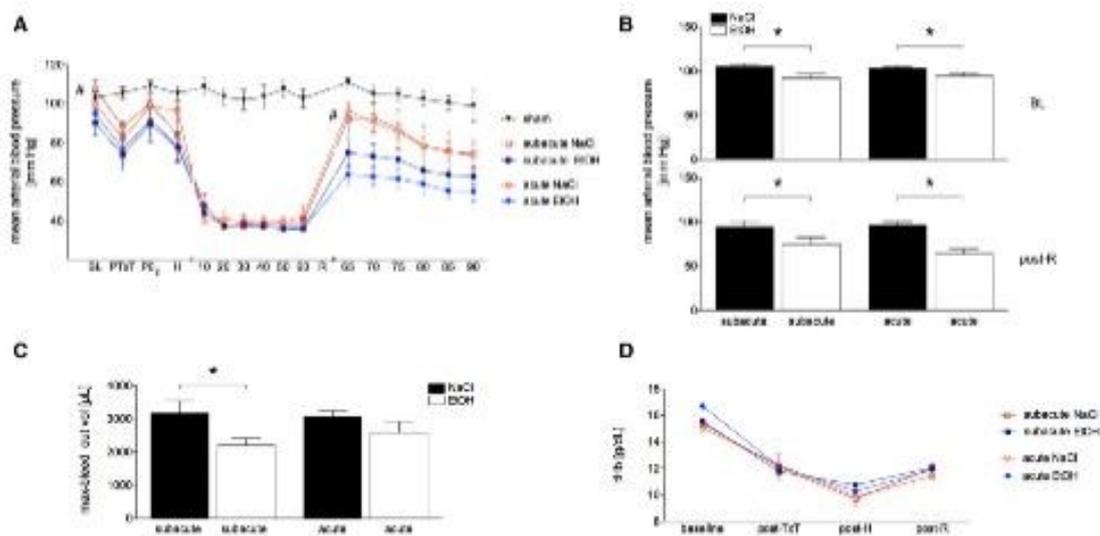
#### Statistical Analysis

Differences between groups were determined by 1-way analysis of variance (ANOVA) using Kruskal–Wallis with Dunn's post hoc test. A *p*-value <0.05 was considered significant. Data are given as mean ± standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## RESULTS

The subacute EtOH group showed a mean BAC of 1.35 ± 0.14 g/l, while the acute EtOH group exerted a mean BAC of 3.28 ± 0.13 g/l.

The sham group showed an MABP of 104.0 ± 4.7 mm Hg with slight deviations during the experiment (Fig. 2A). The subacute and acute NaCl groups exhibited significantly higher baseline MABP values compared to the corresponding EtOH group, respectively (subacute NaCl: 105.1 ± 3.2, acute NaCl: 103.4 ± 1.9, subacute EtOH: 92.1 ± 4.7, and acute EtOH: 94.9 ± 2.9 mm Hg, Fig. 2A,B). TxT induced a



**Fig. 2.** Hemorrhagic shock parameters. Mean arterial blood pressure (MABP) values of all groups during experimentation period (A). MABP was measured before the onset of blunt chest trauma (TxT) (baseline), after TxT (post-TxT), and after hemorrhagic shock (H) and resuscitation (R). The groups received either EtOH or NaCl 2 (acute) or 12 hours (subacute) before the beginning of the experiments. Sham group underwent all surgical procedures without induction of TxT + H/R. Panel (B) denotes baseline (BL) and postresuscitation (post-R) MABP of all groups. Panel (C) shows maximal bleed-out volume of all shock groups. Panel (D) denotes hemoglobin development during experimentation period. \**p* < 0.05; \**p* < 0.05 in subacute and acute NaCl groups versus each corresponding EtOH group.

strong decrease of MABP in all groups with a quick subsequent recovery. The differences between the groups were not significant (Fig. 2A). During hemorrhagic shock, the MABP values in all groups were in the target area. In the resuscitation period, the initial MABP could be reached in none of the groups; however, MABP values in the subacute and acute NaCl groups were higher compared to the corresponding EtOH groups (Fig. 2A,B). A slight decrease of MABP during the resuscitation period was observed in all groups.

The maximal bleed-out volume to induce and maintain hemorrhagic shock was significantly higher in the NaCl group compared to the corresponding EtOH group in the subacute group, and trended to increased volume in acute groups (subacute NaCl:  $3,176 \pm 383$  vs. subacute EtOH:  $2,206 \pm 209 \mu\text{l}$ ,  $p < 0.05$ , and acute NaCl:  $3,081 \pm 156$  vs. acute EtOH:  $2,581 \pm 347 \mu\text{l}$ , respectively, Fig. 2C). Accordingly, tHb dropped slightly after TxT and further after

hemorrhagic shock, and was lower in NaCl groups compared to EtOH groups after hemorrhagic shock (Fig. 2D). After the resuscitation period, tHb increased as expected (Fig. 2D).

A trend to acidic pH was observed in all groups during the experimentation period. The acute EtOH group showed lowest pH values compared to all other groups (baseline pH:  $7.206 \pm 0.042$ , post-TxT pH:  $7.119 \pm 0.029$ , post-H pH:  $7.025 \pm 0.039$ , and post-R pH:  $7.060 \pm 0.356$ , Fig. 3A). In other groups, the pH levels were consistently below 7.35 after hemorrhagic shock. The  $\text{pCO}_2$  levels were initially significantly different among the subacute and acute groups. The  $\text{pCO}_2$  levels increased significantly in the subacute EtOH group compared with the subacute NaCl group ( $67.0 \pm 6.0$  vs.  $52.2 \pm 1.8$  mm Hg,  $p < 0.05$ , Fig. 3B). The rats in the acute EtOH group also had increased  $\text{pCO}_2$  levels compared with the acute NaCl group ( $74.1 \pm 7.7$  vs.  $53.8 \pm 4.3$  mm

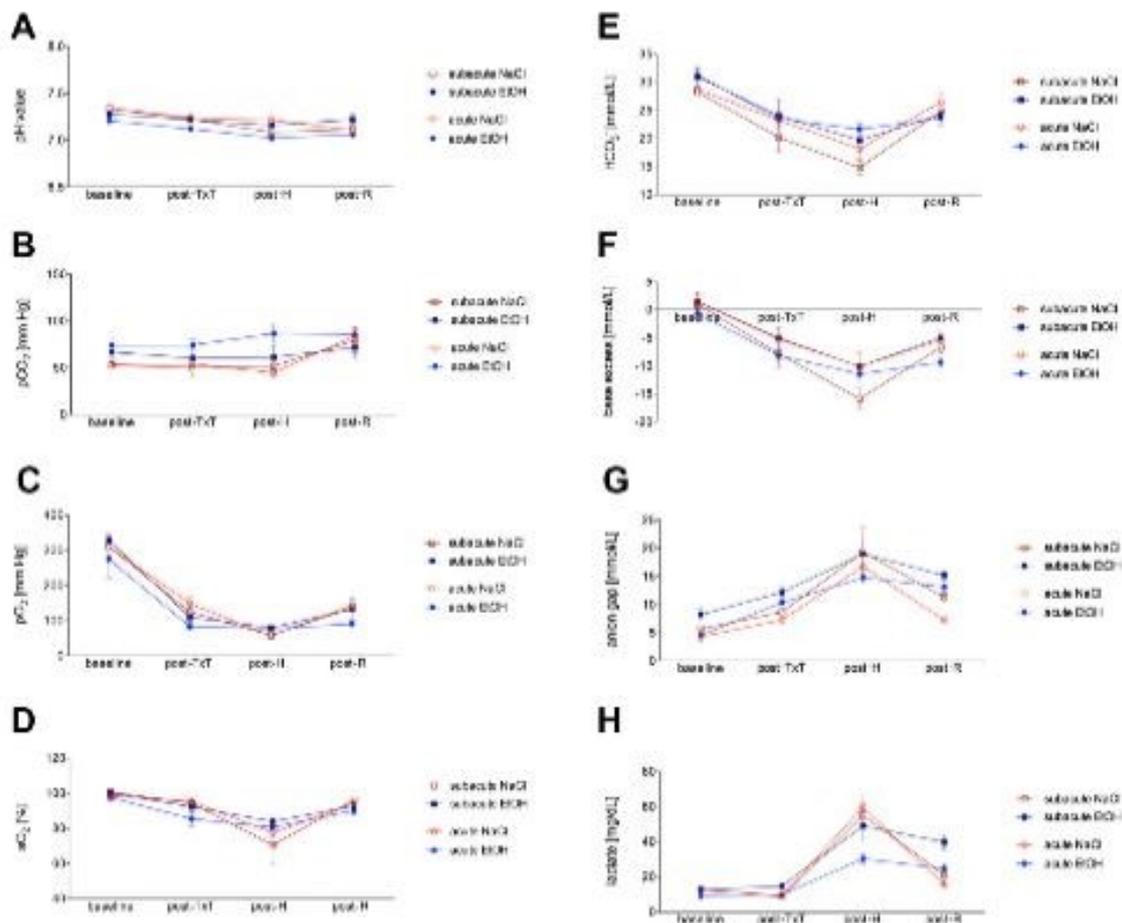


Fig. 3. Blood gas analysis parameters. Panel (A) shows pH values of all groups during before the onset of blunt chest trauma (TxT) (baseline), after TxT (post-TxT), after hemorrhagic shock (post-H), and after resuscitation (post-R). The groups received either EtOH or NaCl (acute) or 12 hours (subacute) before the beginning of the experiments. Sham group underwent all surgical procedures without induction of TxT + HVR.  $\text{pCO}_2$  (B),  $\text{pO}_2$  (C),  $\text{aCl}^-$  (D),  $\text{HCO}_3^-$  (E), base excess (F), anion gap (G), and lactate (H) values of all groups during experimentation period are shown.

Hg,  $p < 0.05$ , Fig. 3B). After the end of experimentation,  $p\text{CO}_2$  levels were comparable among all groups. The  $p\text{O}_2$  levels decreased among all groups by TxT induction, with further decline during hemorrhagic shock, and a slight increase in all groups by resuscitation (Fig. 3C). The baseline  $s\text{O}_2$  values are comparable among all groups (Fig. 3D). Upon further experimentation,  $s\text{O}_2$  values decreased with the induction of TxT followed by hemorrhagic shock in all groups (Fig. 3D). After resuscitation,  $s\text{O}_2$  values were increasing, showing similar values among all groups (Fig. 3D). Thus, all groups developed negative base excess and decreasing  $\text{HCO}_3^-$  values until the end of hemorrhagic shock, and showed increasing base excess and  $\text{HCO}_3^-$  values in the resuscitation period (Fig. 3E,F). In contrast, the anion gap was increasing in all groups until the end of the hemorrhagic shock and decreased in the resuscitation period in NaCl groups, while there was no such prominent decrease in both EtOH groups (Fig. 3G). All groups showed clearly increasing lactate values at the end of hemorrhagic shock, while the increase was smallest in the acute EtOH group (Fig. 3H). Those decreases were markedly pronounced in the NaCl groups compared with the corresponding EtOH group at the end of the resuscitation period (Fig. 3H). The development of respiratory and/or metabolic acidosis is summarized in Fig. 4 as shown in the Davenport diagram.

With respect to the survival rate, there were no significant differences between NaCl groups. Two of 16 animals died during the experimentation, 1 in each group. However, there was a significant difference between the subacute EtOH and the acute EtOH group. In the acute EtOH group, 14 of 20 animals died, of those 12 died during the experimentation

and 2 within 2 hours after experimentation, as compared to 1 deceased animal of 9, which died during the experimentation in the subacute EtOH group ( $p = 0.002$ , Fig. 5).

To further evaluate survivors from nonsurvivors in the acute EtOH group, blood gas analyses were re-evaluated among these 2 groups. In brief, we found significantly lower pH, and  $p\text{O}_2$  and  $s\text{O}_2$  values as well as significantly higher  $p\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  values in the group of nonsurvivors compared with survivors after acute EtOH (Fig. 6). Lactate levels were comparable between those 2 groups, and a slight increase in the nonsurvivors group was observed (Fig. 6).

Consequently, in the next step, we adapted the isoflurane concentration individually in 6 additional animals in the acute EtOH group. Depending on pH values after each blood gas analysis, the isoflurane concentration was reduced or maintained. After this adaptation, the mortality rate in this group (1 of 6) was statistically comparable to NaCl-gavaged animals after TxT + H/R.

## DISCUSSION

In the present study, a novel in vivo research model has been developed that resembles the clinical setting of patients who use alcohol and undergo TxT with subsequent hemorrhagic shock. Due to the high prevalence of patients with traumatic chest injuries (Esmer et al., 2017; Hildebrand et al., 2012) and hemorrhagic shock, as well as their close association with mortality and/or preventable deaths, the clinical relevance of this model is indisputable (Schoeneberg et al., 2017; Spahn et al., 2013). Moreover, the data on alcohols' influence on patients' outcome after trauma are very

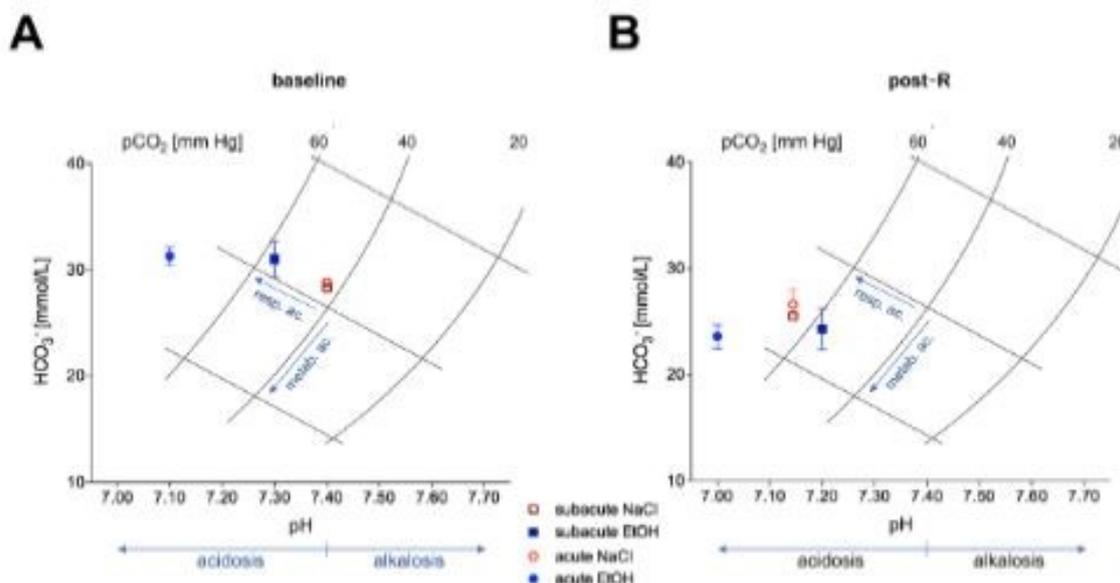


Fig. 4. Davenport diagram showing the degree respiratory (resp.) and metabolic (metab.) acidosis (ac.). Panel (A) shows baseline values and (B) values after experimentation (post-R). The groups received either EtOH or NaCl 2 (acute) or 12 hours (subacute) before the beginning of the experiments. Sham group underwent all surgical procedures without induction of TxT + H/R.

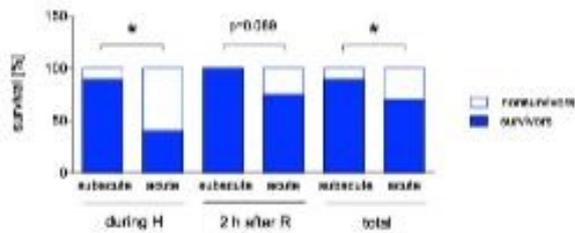


Fig. 5. Survival rate of ethanol groups. The groups received EtOH 2 (acute) or 12 hours (subacute) before the beginning of the experiments. Survival during hemorrhagic shock (during H) and 2 hours after resuscitation (R) as well as total survival is shown. \* $p < 0.05$ .

conflictive, and highlight the relevance of a reproducible rodent model for achieving a better understanding of the underlying pathophysiologic mechanisms (Lustenberger et al., 2011; Relja et al., 2016; Stubig et al., 2012).

Tsukamoto and Pape published a review article in 2009 about different animal models for trauma/hemorrhagic

shock describing advantages and disadvantages of using certain animal species, the differences of applying fixed-volume, fixed-pressure, or uncontrolled hemorrhage for hemorrhagic shock induction, and the existing combinatory trauma models (Tsukamoto and Pape, 2009). The authors concluded that an appropriate model should always carefully address the scientific question, and underlined the need for further in vivo models in order to improve the reproducibility and quantification of data. Majde (2003, pp. S101–S102) pointed out further important variables which should be addressed, such as “physiologic state of the animal, experimental procedures, resuscitation protocol, endpoints and outcomes” for the appropriate hemorrhagic shock experimentation. He underlined the importance of controllability and reproducibility with regard to the pathogenesis of organ injury and physiologic modulations, as well as the requirement of adequate mortality rates (Majde, 2003). Consistent with and based on our previous findings, we have chosen female LEWIS rats, first due to the reproducibility of the alcohol-induced “fatty-like” liver, and second due to the

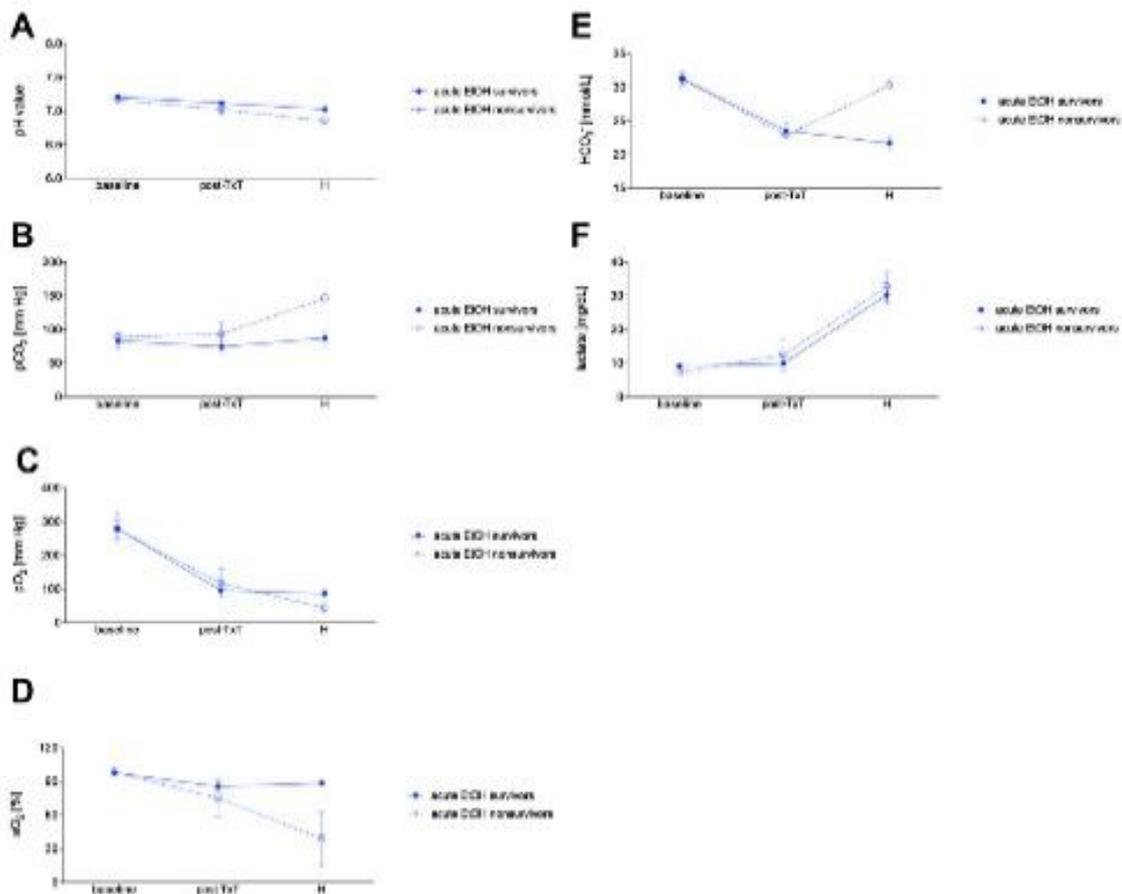


Fig. 6. Blood gas analysis parameters between the survivors and the nonsurvivors in the acute EtOH group. The groups received EtOH 2 (acute) hours before the beginning of the experiments. Panel (A) shows pH before the onset of blunt chest trauma (TxT) (baseline), after TxT (post-TxT), and after hemorrhagic shock (H).  $pCO_2$  (B),  $pO_2$  (C),  $sO_2$  (D),  $HCT_3$  (E), and lactate (F) values are shown.

well-established and described hemorrhagic shock protocol (Relja et al., 2012b, 2013). With regard to lung trauma, the decrease of tHb from baseline to lower post-TxT levels has nicely demonstrated the severity of TxT. However, although the surgical preparation was performed microscopically gentle without significant blood loss, the influence of surgical preparation itself remains to be considered as well. As illustrated in this study, the decrease in blood pressure after TxT is consistent with results of Knöferl and colleagues (2003). In their model, mice exposed to a chest trauma via blast wave have demonstrated the influence of this specific trauma mechanism on the cardiovascular system (Knöferl et al., 2003). However, cardiac output and other variables of possible cardiac dysfunction were not measured in the present study. Nonetheless, in line with the findings of Knöferl and colleagues (2003) the mean blood pressure among all groups did not attain the baseline values either. Interestingly, the mean blood pressure values in both alcohol groups were significantly decreased throughout the whole experimentation period compared to the corresponding control groups. Given the fact that the required bleed-out volume to reach and maintain the target blood pressure during the hemorrhagic shock was lower in the subacute and acute alcohol group compared to the control groups, these data clearly point to alcohol's influence on the cardiovascular system. In regard to the blood volume, the tHb values were lowest in both control groups after the hemorrhagic shock. A previous study by Phelan and colleagues (2002) illustrated that alcohol use in rats correlated to lower MABP, as well as to a smaller amount of blood necessary for the induction of hemorrhagic shock and a lower blood pressure increase during resuscitation compared to nonintoxicated rats. In line with these reports, Molina and colleagues (2004) have shown a pronounced hypotension in alcohol-treated animals compared to controls, resulting in a blunted response of the noradrenergic system in a fixed-volume hemorrhage model. Bilello and colleagues (2011) have confirmed in their retrospective analysis that intoxicated trauma patients with blunt hepatic injuries were more frequently hypotensive compared to patients with a blood alcohol level between 0.0 and 0.08%. Hence, considering these reports, special attention should be paid to blood pressure monitoring in the case of alcohol-intoxicated trauma patients suffering from hemorrhagic shock.

In previous studies, 97 to 100% oxygen mixture has been used in this model of TxT (Liener et al., 2003; Seitz et al., 2008). As a consequence of the subsequent shock with the goal of a hypoxic metabolism, previously, we have chosen a lower oxygen mixture of 60%. However, a lower concentration of 60% oxygen mixture was not possible to apply due to the short-term apnea phase after the TxT. The pO<sub>2</sub> baseline values are caused by anesthesia, but also comparable in similar models. Liener and colleagues (2003) have shown a sharp decrease of pO<sub>2</sub> after TxT also, data which are comparable to our findings. Baseline values were not published by Liener and colleagues (2003), but values detected 6, 24, 48, and 72 hours after TxT were reported. The sham group exhibited continuous

pO<sub>2</sub> values over 300 mm Hg, while the trauma group showed pO<sub>2</sub> values between 200 and 300 mm Hg (Liener et al., 2003). In a different pulmonary contusion model (weight drop-down), Wang and colleagues (2012) have found pO<sub>2</sub> values between 166.23 and 238.78 mm Hg in the trauma groups vs. 397.22 mm Hg in the sham group at sacrifice time. High pO<sub>2</sub> values have been shown in mouse models of TxT, as well. Knöferl and colleagues (2003) have published pO<sub>2</sub> values between 212.3 and 360.0 mm Hg 180 min after TxT in the trauma and sham groups, respectively. Perl and colleagues (2012) have shown in a mouse model of TxT and sepsis pO<sub>2</sub> values of 439 ± 6.2 mm Hg for the sham group versus 316 ± 73.8 mm Hg in the trauma group as measured 36 hours after trauma. Regarding pCO<sub>2</sub>, Perl and colleagues (2012) found 36 hours after chest trauma values of 43.9 ± 5.8 mm Hg in the trauma group versus 32.6 ± 1.6 mm Hg in the sham group. In contrast to the above-reported models, we have performed blood gas analyses during the experiment, in addition to those at sacrifice time points. Therefore, our results represent the dynamic changes during the experiment and show immediate changes caused by lung contusion and shock.

Focusing on hypoxemia, Phelan and colleagues (2002) have found that nonintoxicated animals developed a metabolic acidosis with respiratory compensation, decrease of pCO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an animal model of alcohol intoxication, and hemorrhagic shock. Interestingly, the compensation mechanisms in intoxicated animals were extenuated, and when compared to the control group, intoxicated animals developed an acidosis as shown by decreased pH and higher pCO<sub>2</sub> values (Phelan et al., 2002). As discussed above, Knöferl and colleagues (2003) have shown the impact of TxT on reducing arterial blood gas in a mouse model. Animals that underwent a TxT exhibited lower pO<sub>2</sub> and higher pCO<sub>2</sub> values with no significant pH difference compared to sham controls 180 minutes after trauma (Knöferl et al., 2003). In our study, combining TxT with hemorrhagic shock resulted in an increase of pCO<sub>2</sub>, a decrease of pO<sub>2</sub>, and oxygen saturation with base excess and acidosis. In line with these findings, a change in pO<sub>2</sub> was induced by pulmonary contusion, reflecting the severity and the distribution of chest trauma (Wang et al., 2012). Hence, compared with other models, the data obtained in our study from animals undergoing TxT and hemorrhagic shock with subsequent resuscitation appear reliable. Moreover, the compensatory mechanisms in both control groups have been nicely illustrated.

In regard to alcohol use, similar courses of blood gas analyses as observed in control animals were illustrated. However, there are important differences regarding the levels of observed effects. Both approaches of alcohol use, subacute as well as acute use, prior to experimentation induce a decrease in pH value and an increase in pCO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, indicating that an acute respiratory acidosis, as well as a metabolic acidosis, is developing. Transient respiratory acidosis has been observed in a clinical study of Lamminpää and Vilksa (1991) as well, which has shown a respiratory

acidosis in 31.7% of intoxicated patients in the emergency department. Depression of the breathing rate upon alcohol use is well known (Mittler et al., 1988; Sahn et al., 1975). Our data indicate the existence of a drug-induced respiratory acidosis before experimentation. Interestingly, during/after the experimentation (post-R), in both alcohol groups, the animals exhibited signs of the metabolic acidosis, while this effect was even more pronounced in the acute alcohol group. The subacute alcohol group nicely illustrated a better compensatory response than the acute alcohol group after trauma/hemorrhage. In contrast, the acute alcohol group has shown, on the one hand, lowest pH,  $pO_2$ ,  $sO_2$ ,  $HCO_3^-$  as well as base excess values, and on the other hand, highest  $pCO_2$  and increased lactate values, indicating persisting acidosis. The cause for this phenomenon in this group is probably not only the breathing problem, but also a metabolic problem due to severe alcohol intoxication combined with trauma/hemorrhage. Acute and particularly chronic alcohol consumption, which can potentially lead to alcoholic ketoacidosis, is associated with an increased anion gap (Höjer, 1996; Wolff et al., 2012). Similarly, toxic alcohol intake, for example, methanol intoxication or ethylene glycol intoxication, is a potential reason for an elevated anion gap. Regarding our model, further research is necessary to elaborate the normal anion gap. On the one hand, our animals developed an acute respiratory acidosis and a metabolic acidosis as well, which may also influence the anion gap; on the other hand, we did not monitor the renal function. Therefore, in future studies, renal function and urine excretion should be addressed. In line with the breathing and metabolic problem as discussed above, the acute alcohol group has shown the highest mortality rate. After adapting the isoflurane concentration individually according to the results from blood gas analysis, the severity of respiratory acidosis (data not shown), as well as significantly reduced mortality rate in the acute EtOH group has been reduced after TxT + H/R. These data nicely demonstrate the diminished ability to adapt/compensate acidosis in acutely intoxicated animals. The evaluation of data obtained after blood gas analysis in 3 animals of this group has shown that there is an improved compensatory capacity upon anesthesia adaptation (data not shown). This clearly indicates that alcohol attenuates the metabolic and respiratory compensation capability and therefore promotes mortality in this model. In a clinical study, Shiraiishi and colleagues (2003) found in healthy, intoxicated volunteers that respiratory compensation was influenced by alcohol, as well. Stratifying survivors from nonsurvivors showed that the severity of combined metabolic and respiratory acidosis was promptly increased during hemorrhagic shock in nonsurvivors compared with survivors.

There are several limitations of our study, which must be pointed out. The aim of our study was to investigate the influence of alcohol on TxT and hemorrhagic shock. We tried to select a control group as close as possible to the realistic clinical scenario. Therefore, the control group was chosen to represent the nonalcoholic trauma patients, and the

control group was not fed with isocaloric diet but NaCl. Although the use of NaCl as control gavage fluid is well accepted in models of acute alcohol gavage with a single bolus, an isocaloric gavage may be an option for future studies. According to ethical reasons, all experiments have been performed under anesthesia/painkillers, which might influence the physiology. Furthermore, our experimental groups cannot reproduce the variability that is found in trauma patients, including history of disease and co-medications. Moreover, cardiac output as well as cardiac function parameters, and both systemic and lung inflammation can be included in future studies. Another important and unfortunately neglected influencing factor is the dose of EtOH, or probably equally relevant, the dose of its toxic metabolites. Considering this, it is decisive to remember that EtOH may dose-dependently act, and therefore, the influence of its dose, as well as its metabolites, remains to be elaborated in further studies. However, as this is a pilot study aiming at establishing a relevant trauma model with adequate alcohol use, this model can be used in subsequent research.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kerstin Konradowitz, Katrin Jurida, and Alexander Schaible for outstanding technical assistance.

#### FUNDING

The study was supported by DFG RE 3304/5-1 and PE 908/3-1.

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors have nothing to declare and have no conflict of interests.

#### REFERENCES

- Alum HB, Hamwi KB, Duggan M, Fikry K, Lu J, Fukudome EY, Chong W, Bramos A, Kim K, Velmahos G (2011) Hemostatic and pharmacologic resuscitation: results of a long-term survival study in a swine polytrauma model. *J Trauma* 70:636-645.
- Billelo J, McCray V, Davis J, Jackson L, Danos LA (2011) Acute ethanol intoxication and the trauma patient: hemodynamic pitfalls. *World J Surg* 35:2149-2153.
- Esmer E, Derst P, Lefering R, Schulz M, Siekmann H, Delank KS (2017) Prehospital assessment of injury type and severity in severely injured patients by emergency physicians: an analysis of the TraumaRegister DGU(R). *Unfallchirurg* 120:409-416.
- Hildebrand F, Wooster M, Moemmsen P, Mohr J, Frohlich M, Witte I, Koibl C, Ruchholtz S, Seekamp A, Pape HC, Flohe S, van Griensven M (2012) A combined trauma model of chest and abdominal trauma with hemorrhagic shock—description of a new porcine model. *Shock* 38:664-670.
- Höjer J (1996) Severe metabolic acidosis in the alcoholic: differential diagnosis and management. *Hum Exp Toxicol* 15:482-488.
- Jurkovich GJ, Rivara FP, Gurney JG, Fligner C, Ries R, Mueller BA, Copass M (1993) The effect of acute alcohol intoxication and chronic alcohol abuse on outcome from trauma. *JAMA* 270:51-56.

- Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Bruckner UB, Kinzl L, Gebhard F (2003) Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19:519–525.
- Kozan R, Ayyıldız M, Yikilirm M, Agar E (2009) The effect of alpha-tocopherol in the acute ethanol intake and its withdrawal on penicillin-induced epilepsy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 69:177–188.
- Lammingua A, Vilksa J (1991) Acid-base balance in alcohol users seen in an emergency room. *Vet Hum Toxicol* 33:482–485.
- Lehnert M, Relja B, Sun-Young LV, Schweska B, Henrich D, Czerny C, Froh M, Borsello T, Marzi I (2008) A peptide inhibitor of C-jun N-terminal kinase modulates hepatic damage and the inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 30:159–165.
- Liener UC, Knöferl MW, Strater J, Barth TF, Pausser EM, Nussler AK, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F (2003) Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 20:511–516.
- Lustenberger T, Inaba K, Barnapras G, Talving P, Plura D, Lam L, Konstantinidis A, Demetriades D (2011) Ethanol intoxication is associated with a lower incidence of admission coagulopathy in severe traumatic brain injury patients. *J Neurotrauma* 28:1699–1706.
- Majda JA (2003) Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *J Trauma* 54:S100–S105.
- Mitler MM, Dawson A, Henriksen SJ, Sobers M, Bloom FE (1988) Bedtime ethanol increases resistance of upper airways and produces sleep apnea in asymptomatic snorers. *Alcohol Clin Exp Res* 12:801–805.
- Molina PE, Zambell KL, Norenberg K, Eason J, Phelan H, Zhang P, Stouwe CV, Carnal JW, Porreta C (2004) Consequences of alcohol-induced early dysregulation of responses to trauma/hemorrhage. *Alcohol* 33:217–227.
- Perl M, Hohmann C, Denk S, Kellermann P, Lu D, Braumüller S, Bachem MG, Thomas J, Knöferl MW, Ayala A, Gebhard F, Huber-Lang MS (2012) Role of activated neutrophils in chest trauma-induced septic acute lung injury. *Shock* 38:98–106.
- Phelan H, Stahls P, Hunt J, Bagby GJ, Molina PE (2002) Impact of alcohol intoxication on hemodynamic, metabolic, and cytokine responses to hemorrhagic shock. *J Trauma* 52:675–682.
- Prunet B, Cordier PY, Prat N, Bourmont S de, Couret D, Lambert D, Michelet P (2016) Short-term effects of low-volume resuscitation with hypertonic saline and hydroxyethylstarch in an experimental model of lung contusion and haemorrhagic shock. *Anaesth Crit Care Pain Med* doi.org/10.1016/j.accpm.2016.05.010 [Epub ahead of print].
- Relja B, Henrich D, Wetzel G, Sander AL, Jakob H, Maraslioglu M, Marzi I, Lehnert M (2013) Effects of acute ethanol gavage on intestinal integrity after hemorrhage/resuscitation. *Scand J Gastroenterol* 48:448–458.
- Relja B, Hohn C, Bornmann F, Seyboth K, Henrich D, Marzi I, Lehnert M (2012a) Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after hemorrhage and resuscitation in vivo. *Br J Pharmacol* 165:1188–1199.
- Relja B, Menke J, Wagner N, Auner B, Voth M, Nau C, Marzi I (2016) Effects of positive blood alcohol concentration on outcome and systemic interleukin-6 in major trauma patients. *Injury* 47:640–645.
- Relja B, Schweska B, Lee VS, Henrich D, Czerny C, Borsello T, Marzi I, Lehnert M (2009) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and inflammatory response in male rats. *Shock* 32:509–516.
- Relja B, Wilhelm K, Wang M, Henrich D, Marzi I, Lehnert M (2012b) Acute ethanol gavage attenuates hemorrhage/resuscitation-induced hepatic oxidative stress in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012:983427.
- Ristic B, Rancic N, Maksimovic M, Ignjatovic-Ristic D (2013) The influence of alcohol intoxication on the severity of injuries suffered by drivers in road traffic accidents. *Eur J Trauma Emerg Surg* 39:363–368.
- Rixen D, Raam M, Holografco B, Sauerland S, Nagelschmidt M, Neugebauer HA (2001) A pig hemorrhagic shock model: oxygen debt and metabolic acidemia as indicators of severity. *Shock* 16:239–244.
- Robinson S, Bergliss JB, Denson JL, Berkner J, Anstine CV, Winer JL, Maxwell JR, Qiu J, Yang Y, Sillerud LO, Meehan WP, Mannix R, Justiz LL (2017) Microstructural and microglial changes after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Res* 95:1025–1035.
- Sahn SA, Lakshminarayan S, Pierson DJ, Weil JV (1975) Effect of ethanol on the ventilatory responses to oxygen and carbon dioxide in man. *Clin Sci Med* 49:33–38.
- Sakran JV, Greer SE, Werlin E, McCann M (2012) Care of the injured worldwide: trauma still the neglected disease of modern society. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 20:64.
- Scheyerer MJ, Dutschler J, Billeter A, Zimmermann SM, Sprengel K, Werner Clement ML, Simmen H-P, Wanner GA (2014) Effect of elevated serum alcohol level on the outcome of severely injured patients. *Emerg Med J* 31:813–817.
- Schoeneberg C, Schilling M, Husemann B, Schmitz D, Lendemann S, Ruchholtz S (2017) Preventable and potentially preventable deaths in severely injured patients: a retrospective analysis including patterns of errors. *Eur J Trauma Emerg Surg* 43:481–489.
- Seitz DH, Perl M, Liener UC, Tauchmann B, Braumüller ST, Bruckner UB, Gebhard F, Knöferl MW (2011) Inflammatory alterations in a novel combination model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma* 70:189–196.
- Seitz DH, Perl M, Mangold S, Noddermann A, Braumüller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knöferl MW (2008) Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock* 30:537–544.
- Shiraishi K, Watanabe M, Motegi S, Nagaoka R, Matsuzaki S, Ikemoto H (2003) Influence of acute alcohol load on metabolism of skeletal muscles—expired gas analysis during exercise. *Alcohol Clin Exp Res* 27:765–788.
- Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Durantau J, Fernandez-Mondejar E, Filipescu D, Hunt BJ, Komadina R, Nardi G, Neugebauer E, Ozier Y, Riddez L, Schultz A, Vincent J-L, Rossaint R (2013) Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care* 17:R76.
- Statistisches Bundesamt. (2014a) Alkoholförderung Sterbefälle nach Todesursachenstatistik 2014, Statistisches Bundesamt (Destatis), Wiesbaden. Available at: <http://www.destatis.de>. Accessed September 17, 2016.
- Statistisches Bundesamt. (2014b) Aus dem Krankenhaus entlassene vollstationäre Patienten nach Krankenhausdiagnosestatistik 2014, Statistisches Bundesamt (Destatis), Wiesbaden. Available at: <http://www.destatis.de>. Accessed September 17, 2016.
- Statistisches Bundesamt. (2014c) Sterbefälle 2014 durch Unfälle nach Todesursachenstatistik 2014, Statistisches Bundesamt (Destatis), Wiesbaden. Available at: <http://www.destatis.de>. Accessed September 17, 2016.
- Stohig T, Petri M, Zeckey C, Brand S, Müller C, Otte D, Krettek C, Haasper C (2012) Alcohol intoxication in road traffic accidents leads to higher impact speed difference, higher ISS and MAIS, and higher preclinical mortality. *Alcohol* 46:681–686.
- Tsukamoto T, Pape HC (2009) Animal models for trauma research: what are the options? *Shock* 31:3–10.
- Vasdev S, Gill V, Singal PK (2006) Beneficial effect of low ethanol intake on the cardiovascular system: possible biochemical mechanisms. *Vasc Health Risk Manag* 2:263–276.
- Wagner N, Akbarpour A, Mors K, Voth M, Stormann P, Auner B, Lehnert M, Marzi I, Relja B (2016) Alcohol intoxication reduces systemic interleukin-6 levels and leukocyte counts after severe TBI compared with not intoxicated TBI patients. *Shock* 46:261–269.
- Wang S, Raan Z, Zhang J, Zheng J (2012) A modified rat model of isolated bilateral pulmonary contusion. *Exp Ther Med* 4:425–429.
- Webster KM, Wright DK, Sun M, Semple BD, Ozbark E, Stein DG, O'Brien TJ, Shultz SR (2015) Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 12:238.
- Wolff HP, Weibrecht TR, Diener HC (2012) Internistische Therapie: 2012/2013 – mit Zugang zum Elsevier-Portal. Urban & Fischer in Elsevier, München.

## 6. Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name, Vorname	Franz, Jan-Niklas
Geburtsdatum/-ort	02.09.1990 in Frankfurt am Main
Anschrift	Schönstraße 18 60327 Frankfurt am Main
Mobil	0151 /28048907
Email	nfranz@gmx.de
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### ■ Schulbildung

1997 – 2001	Besuch der Erich-Kästner-Grundschule in Frankfurt am Main
2001 – 2010	Besuch des Liebig-Gymnasiums in Frankfurt am Main, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### ■ Studium

10/2011 bis heute	Studium der Humanmedizin an der Goethe-Universität in Frankfurt a. M.
08/2013	Absolvierung des 1. Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note - befriedigend - (3,0)
04/2017	Absolvierung des 2. Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note - befriedigend - (3,0)

10/2017 – 10/2018      Praktisches Jahr am Uniklinikum Frankfurt am Main,  
Wahlfach Anästhesie

11/2018      Absolvierung des 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit  
der Note - gut -

### **Famulaturen**

02/2016      Unfallchirurgie/ Universitätsklinikum Frankfurt a. M.

05/2016      Unfallchirurgie/ BG Unfallklinik Frankfurt a. M.

06/2016      Innere Ambulanz/ Universitätsklinikum Frankfurt a. M.

08/2016      Allgemeinmedizin/ Dr. Medic. Theodor / Roßdorf

### **Promotion**

ab 02/2015      Tierexperimentelle Promotionsarbeit zum Einfluss  
akuter Alkoholintoxikation auf die posttraumatische  
Immunantwort nach Thoraxtrauma und  
Hämorrhagischem Schock an der Universitätsklinik für  
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Frankfurt a. M.

### ■ **Beruflicher Werdegang**

seit 04/2019      Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum  
Frankfurt am Main

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## 7. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Der Einfluss akuter Alkoholintoxikation auf die posttraumatische Immunantwort nach Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock“

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Frau Prof. Dr. Borna Relja ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

„Alcohol-binge reduces systemic leucocyte activation and pulmonary PMN infiltration after blunt chest trauma and hemorrhagic shock.”

Franz N, Dieteren S, Köhler K, Mörs K, Sturm R, Marzi I, Perl M, Relja B, Wagner N. Inflammation. 2018 Nov 9. doi: 10.1007/s10753-018-0927. [Epub ahead of print]

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei den Menschen, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Dabei blicke ich auf eine durchweg positive Zeit zurück. Sowohl die wissenschaftliche Tätigkeit als auch die freundschaftliche Zusammenarbeit mit den Kollegen haben mir viel Freude gemacht.

Ich danke in erster Linie meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Borna Relja für die perfekte Betreuung während der Arbeit und die aufgebrauchte Geduld. Sie hat mich die gesamte Zeit tatkräftig unterstützt, mein wissenschaftliches Interesse gefördert, bei Fragen jederzeit ein offenes Ohr gehabt und stets die richtigen Worte gefunden. Ohne sie wäre die gesamte Arbeit nicht möglich gewesen. Auch danke ich ihr für die Unterstützung bei der Anfertigung meiner ersten Publikationsschrift und der Präsentation der Ergebnisse auf den Kongressen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Scott Dieteren, mit welchem ich mir die praktische Durchführung der verschiedenen Forschungsprojekte aufgeteilt habe. Eine solche durchweg produktive und gewissenhafte Zusammenarbeit ist nicht selbstverständlich. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form nicht fertiggestellt worden. Auch möchte ich mich bei Frau Kerstin Konradowitz, Frau Katrin Jurida und Herrn Alexandler Schaible für die Einarbeitung im Forschungslabor sowie für die Unterstützung bei der praktischen Versuchsdurchführung bedanken. Frau Elsie Oppermann danke ich für ihre Hilfestellung bei der technischen Einarbeitung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen am BD FACS Canto II.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern Karin Franz und Andreas Franz, die mich in all meinen Entscheidungen auf meinem Lebensweg unterstützt haben und auf welche ich mich immer verlassen kann. Ohne sie wären mein Studium und damit die Doktorarbeit nicht möglich gewesen.