

Aus der Universitätsklinik für Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Auswirkungen von Alkoholkonsum auf das angeborene Immunsystem gesunder
Probanden

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: Florian Lukas Haag
aus: Bretten (Baden-Württemberg)
Magdeburg: 2021

Bibliographische Beschreibung:

Haag, Florian Lukas:

Die Auswirkungen akuten Alkoholkonsums auf Anzahl und Funktion der Leukozyten bei gesunden Probanden. - 2021. - 98 Bl., 17 Abb., 0 Tab., 0 Anl.

Kurzreferat:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen von Alkohol in Relation zu Zeit und Dosis auf das angeborene Immunsystem darzustellen. Dafür wurde ein Versuchsaufbau mit 22 gesunden Probanden gewählt. Die Probanden tranken über vier Stunden hinweg in regelmäßigen Abständen eine vorher berechnete Menge eines *Whiskey-Cola*-Mischgetränkes, um innerhalb von vier Stunden nach Versuchsbeginn eine Blutalkoholkonzentration von 1‰ zu erreichen. Über diesen Zeitraum wurde ihnen zu vordefinierten Zeitpunkten Blut abgenommen, um daraus Leukozyten, Granulozyten und Monozyten zu isolieren. Es wurden Zellzahl, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Phagozytoseaktivität und Apoptoseaktivität bestimmt. Es konnte sowohl eine Auswirkung des Alkoholkonsums auf die Zellzahlen als auch eine veränderte ROS-Produktion sowie eine verminderte Phagozytoseaktivität beschrieben werden. Ebenso wurde verstärkte Apoptoseaktivität gezeigt. Des Weiteren wurden funktionelle Veränderungen der einzelnen Monozyten *Subsets* mit einer anfänglich vermehrten Freisetzung der klassischen, gefolgt von einem *Shift* zu den nicht-klassischen Monozyten gezeigt. Überdies wurden Modulationen im Adhäsionsverhalten und der *Toll-Like Receptor 4*-Expression der Monozyten beobachtet. Zusätzliche Analysen der Ursachen für die systemischen Auswirkungen des Alkohols auf Leukozyten ergaben eine systemisch erhöhte Konzentration des intestinalen *Fatty Acid Binding* Proteins als Biomarker für die Darmpermeabilität insbesondere bei männlichen Probanden.

Schlüsselwörter

Alkohol, Granulozyten, Monozyten, ROS, Phagozytose, Apoptose, FABP-I, Darmbarriere

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Abbildungsverzeichnis	5
3	Veröffentlichungen	6
4	Einführung.....	7
5	Material und Methoden	13
	5.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	13
	5.2 FACS Analysen.....	14
	5.3 ELISA Analysen	14
	5.4 Adhäsionsversuch.....	14
	5.5 Statistische Auswertung.....	15
6	Ergebnisse	16
	6.1 Blutalkohol	16
	6.2 Darmintegrität.....	16
	6.3 Zellzahl.....	19
	6.4 TLR4 Expression und Signalübertragung der Monozyten.....	21
	6.5 Phagozytose-Aktivität.....	24
	6.6 ROS-Produktion	26
	6.7 Apoptoseaktivität.....	27
	6.8 Adhäsionsverhalten der Monozyten	29
7	Diskussion.....	30
	7.1 Alkohol reduziert die Darmintegrität und steigert die Endotoxinbioaktivität	31
	7.2 Alkoholkonsum zeigt einen frühen pro- und einen späten anti-inflammatorischen Effekt auf die Anzahl der Leukozyten.....	33
	7.3 Alkohol vermittelt einen frühen Anstieg der Apoptose in Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten.....	35
	7.4 Alkohol zeigt einen frühen pro- und einen späten anti-inflammatorischen Effekt auf die Monozyten-Subsets.....	36
	7.5 Alkoholkonsum induziert eine verstärkte Expression von TLR4 auf Monozyten bei gleichbleibender Caspase 1-Aktivität und reduzierter IL-1 β -Ausschüttung	37
	7.6 Alkohol induziert Toleranzbildungen gegenüber PAMPs	39
	7.7 Alkohol verringert die ROS-Bildung und Phagozytose-Aktivität der Leukozyten.....	40
	7.8 Alkoholkonsum verringert die Adhäsion von humanen Monozyten an A549-Zellkulturen	43

7.9	Abschluss und Ausblick	44
7.10	Limitationen der Studie	46
8	Zusammenfassung.....	48
9	Literatur	49
10	Danksagungen	60
11	Ehrenerklärung.....	61
12	Darstellung des Bildungsweges	62
13	Publikationen.....	63
13.1	Publikation 1:.....	63
13.2	Publikation 2:.....	75
13.3	Publikation 3:.....	88

1 Abkürzungsverzeichnis

BAC: *Blood alcohol concentration*

CD: *Cluster of differentiation*

DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern*

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FABP: *Fatty Acid Binding Protein*

FACS: *Fluorescence-activated Cell Sorting*

HV: *Healthy Volunteers*, gesunde Probanden

IL: *Interleukin*

ISS: *Injury Severity Score*

LDL: *Low Density Lipoprotein*

LPS: *Lipopolysaccharide*

MCP: *Monocyte-Chemoattractant-Protein*

MFU: *Mean Fluorescence Units*, mittlere Fluoreszenzeinheiten

MODS: *Multi Organ Dysfunction Syndrome*, Multiples Organversagen

MOV: *Multiorganversagen*

NF- κ B: *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells*

PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PMN: *Polymorphonuclear Leukocytes*, polymorphonukleäre Leukozyten

PRR: *Pattern Recognition Receptors*

ROS: *Reactive Oxygen Species*, reaktive Sauerstoffspezies

SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

TLR4: *Toll-like Receptor 4*

TNF: *Tumornekrosefaktor*

WHO: *World Health Organization*

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Versuchsaufbau.....	13
Abbildung 2: Verlauf der Blutalkoholkonzentration	16
Abbildung 3: Verlauf der <i>intestinal Fatty Acid Binding Protein</i> (FABP-I) Konzentrationen.	17
Abbildung 4: Verlauf der Syndecan-1 Konzentrationen	17
Abbildung 5: Verlauf der Konzentration von löslichem (<i>soluble</i>) <i>Cluster of Differentiation</i> 14 (sCD-14) bei gesunden Probanden.....	18
Abbildung 6: <i>Spearman</i> -Analyse der Korrelation zwischen dem löslichem (<i>soluble</i>) <i>Cluster of Differentiation</i> 14 (sCD14) und dem intestinalen <i>Fatty Acid Binding Protein</i> (FABP-I).	18
Abbildung 7: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Anzahl der Zellen des angeborenen Immunsystems bei gesunden Probanden	19
Abbildung 8: Repräsentative <i>Gating</i> Strategie der Monozyten.....	20
Abbildung 9: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Verteilung der Monozyten- <i>Subsets</i> bei gesunden Probanden.....	20
Abbildung 10: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Oberflächenpräsentation des <i>Toll-like Receptors</i> 4 (TLR4) auf den Monozyten von gesunden Probanden.....	22
Abbildung 11: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Inflammasom-Aktivierung von Monozyten und deren Adhäsionsfähigkeit nach <i>ex vivo</i> Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS).....	23
Abbildung 12: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Interleukin (IL)-1 β -Sekretion im Serum gesunder Probanden.....	24
Abbildung 13: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf den Anteil phagozytischer Leukozyten, Granulozyten und Monozyten bei gesunden Probanden. 25	25
Abbildung 14: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Phagozytose von Leukozyten, Granulozyten und Monozyten bei gesunden Probanden	26
Abbildung 15: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Leukozyten, Granulozyten und Monozyten bei Probanden	27
Abbildung 16: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf den Anteil der apoptotischen Leukozyten, Granulozyten und Monozyten bei gesunden Probanden	28
Abbildung 17: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Apoptose von Leukozyten, Granulozyten und Monozyten bei gesunden Probanden.....	29

3 Veröffentlichungen

Publikation 1:

Haag F., Janicova A., Xu B., Powerski M., Fachel M., Bundkirchen K., Neunaber C., Marzi I., Relja B., Sturm R.:

Reduced phagocytosis, ROS production and enhanced apoptosis of leukocytes upon alcohol drinking in healthy volunteers.

Eur J Trauma Emerg Surg. 2021 Mar 30. doi: 10.1007/s00068-021-01643-x. PMID: 33783566

Publikation 2:

Janicova A., **Haag F.**, Xu B., Garza A.P., Dunay I.R., Neunaber C., Nowak A., Cavalli P., Marzi I., Sturm R., Relja B.:

Acute alcohol intoxication modulates monocyte subsets and their functions in a dose- and time-dependent manner in healthy volunteers.

Frontiers in Immunology. 2021 Mai 18. doi: 10.3389/fimmu.2021.652488

Publikation 3:

Sturm R., **Haag F.**, Janicova A., Xu B., Vollrath J.T., Bundkirchen K., Dunay I.R., Neunaber C., Marzi I., Relja B.:

Acute alcohol consumption increases systemic endotoxin bioactivity for days in healthy volunteers – with reduced intestinal barrier loss in female.

Eur J Trauma Emerg Surg. 2021 Apr 11. doi: 10.1007/s00068-021-01666-4. PMID: 33839799

4 Einführung

Der „*Global status report on alcohol and health*“ der *World Health Organization* (WHO) gab 2018 an, dass weltweit 43% der über 15-Jährigen Alkohol konsumieren (1). Im selben Jahr äußerten bei einer Befragung 71,6% der Deutschen, in den letzten 30 Tagen vor der Umfrage Alkohol konsumiert zu haben (2). Dabei stellt Alkohol in der Menschheitsgeschichte eine besonders häufig missbrauchte Substanz mit einem hohen Suchtpotential dar (3). Besonders in Zeiten der Krise, wie beispielsweise der Corona-Pandemie, kommt es zu erhöhtem Alkoholkonsum in der Bevölkerung und zu einem Anstieg der alkoholassoziierten Erkrankungen (4–7). Zu den Erkrankungen, deren Entstehung durch Alkohol begünstigt werden, zählen unter anderem Leberzirrhose und Leberkarzinome (8), periphere arterielle Verschlusskrankheiten und Schlaganfall (9), sowie oropharyngeale und gastrointestinale Tumore (10–12). Ebenso ist der übermäßige Konsum von Alkohol mit der Entstehung von Demenz und strukturellen Veränderungen des Gehirns assoziiert (13). Zusätzlich erhöht Alkoholkonsum das Risiko, zu verunfallen und ein Trauma zu erleiden (1). Dies gilt vor allem für Menschen, die selten Alkohol trinken (14). Dabei korreliert die Blutalkoholkonzentration (*Blood Alcohol Concentration: BAC*) positiv mit der Verletzungsschwere (*Injury Severity Score: ISS*) (15).

Eine mögliche Erklärung für die veränderten Krankheitsverläufe Alkohol konsumierender Individuen liegt in dessen Auswirkungen auf das Immunsystem. So ist beispielsweise bereits die Darmwand durch den Alkoholkonsum betroffen. Sie stellt eine natürliche Barriere und somit einen Schutz gegen mögliche pathogene Erreger dar (16). In diesem Zusammenhang konnte durch Sepsisversuche an chronisch alkoholisierten Mäusen gezeigt werden, dass die Zellen des Darmepithels durch die Auswirkung des Alkohols vermehrt in die Apoptose gehen und die Darmbarriere so gestört wird (17). Bei einem anderen Versuch wurden Mäuse einmalig mit Alkohol und einem Zuckergemisch aus Lactulose, Mannitol und Sucralose gefüttert. Die alkoholintoxikierten Mäuse nahmen diese schwer resorbierbaren Zucker auf und schieden sie über den Urin wieder aus. Die Lactulose/Mannitol Ratio dient dabei als Marker für die Dünndarmpermeabilität während das Verhältnis Lactulose/Mannitol im Urin den nicht-carrier-vermittelten Transport des Dünndarms widerspiegelt. Die Saccharose-Ausscheidung reflektiert also die Magenpermeabilität während Sucralose die Dickdarmpermeabilität widerspiegelt. Die Ergebnisse der o.g. Studie lassen darauf

schließen, dass bereits der einmalige Alkoholkonsum die Integrität der Darmbarriere stört (18). Weitere Marker für die Funktionalität der Darmbarriere sind *intestinal Fatty Acid Binding Protein* (FABP-I) und Syndecan-1. FABP-I wird in den Enterozyten von Dünn- und Dickdarm exprimiert (19). Es kann als Biomarker für Verletzungen des Darms und intestinaler Ischämien, die mit einem Barriereverlust einhergehen, dienen (19–22). Syndecan-1 ist ein transmembranes Heparansulfatproteoglykan und wird vorwiegend auf der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen und Plasmazellen exprimiert. Es spielt sowohl eine Rolle bei Zellmatrix-Interaktionen als auch bei Zell-Zell-Bindungen, Migration, Signalübertragung und Proliferation der Zellen (23, 24). Diese Eigenschaften lassen Syndecan-1 eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Darmbarriere zukommen (25). So zeigen sich beispielsweise bei Kindern mit Zöliakie, deren Darmbarriere krankheitsbedingt gestört ist, erhöhte Spiegel an gelöstem Syndecan-1 im Serum (26). Ebenso ist Syndecan-1 im Serum bei hyperglykämischen Zuständen erhöht, was mit einem Verlust der *tight junctions* und einer Dysfunktion des Darmepithels assoziiert ist (27). Durch Schäden der Darmbarriere können Mikroorganismen in die Zirkulation gelangen und eine Entzündungsreaktion hervorrufen (16). Ein indirekter Marker für die Endotoxinbioaktivität stellt das lösliche *Cluster of Differentiation 14 (soluble CD14 (sCD14))* dar (28). CD14 ist ein Oberflächenantigen, das auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es kommt membrangebunden oder im Blut gelöst vor (29). Das sCD14 bindet Lipopolysaccharide (LPS) und überträgt sie auf das membrangebundene CD14, das als Co-Rezeptor für den *Toll-like Receptor 4 (TLR4)* dient. Außerdem kann sCD14 LPS direkt auf den TLR4-Rezeptorkomplex übertragen werden (29, 30). Ebenso reduziert sCD14 die Entzündungsreaktion, indem es an LPS bindet und so die Menge an freiem LPS, an das Monozyten binden können, reduziert (31).

Neben den Auswirkungen auf die Darmbarriere zeigt sich die Wirkung des Alkohols auch an den neutrophilen Granulozyten und an den Monozyten, die zum angeborenen und antigenunspezifischen Teil des menschlichen Immunsystems gehören und einen wichtigen Abwehrmechanismus gegenüber Infektionen darstellen (32–34). Eine verminderte Reaktion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten auf Stimuli wie *Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)* und *Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)* führt im Falle einer Infektion, mit einer erhöhten Inzidenz

an Komplikationen wie Sepsis, zu (Multi-)Organversagen (*Multi Organ Dysfunction Syndrome* (MODS)) sowie zu einer erhöhten Mortalität (35–37). Der Effekt des Alkohols auf die Zellen des Immunsystems zeigt sich in einem biphasischen Verlauf und ist abhängig von Expositionszeit und Dosis (38–40). So steigt in den ersten 20 Minuten nach dem Alkoholkonsum die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen an. Dies deutet auf eine frühe pro-inflammatorische Reaktion hin. Diese wird gefolgt von einer anti-inflammatorischen Reaktion mit einem Rückgang der Monozyten und der natürlichen Killerzellen im Blut. Ebenso fallen die Werte der pro-inflammatorischen Marker wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und *Monocyte-Chemoattractant-Protein* (MCP)-1 im Blutkreislauf ab und das anti-inflammatorische IL-10 steigt an (38, 40, 41). Diese spätere anti-inflammatorische Wirkung ist auf die Entstehung von Toleranzen gegenüber Gefahrenmediatoren wie PAMPs zurückzuführen (42). Durch diese Toleranzen kommt es zu einer verminderten Funktion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren wirkt sich diese Toleranz auf Gewebsinvasion sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus und reduziert die Phagozytoseaktivität der genannten Zellen (33, 43–45). Auch in Tierexperimenten zeigte sich, dass die Apoptoseaktivität von Monozyten und Granulozyten unter Alkoholeinfluss abnimmt (43).

Um die Entstehung der Toleranzen gegenüber PAMPs verstehen zu können, ist es wichtig zu wissen, wie die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Hierbei spielt unter anderem der TLR4 eine Rolle. TLR4 wird hauptsächlich in Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, aber auch in einigen anderen Zellarten wie Endothelzellen (44). Die TLRs gehören zu den *Pattern-Recognition-Receptors* (PRRs). Sie erkennen PAMPs wie Bestandteile von Mikroorganismen, einschließlich Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten (45). Der TLR4 detektiert unter anderem Antigene wie LPS, aber auch endogene Strukturen wie *Low Density Lipoproteine* (LDL), die zu der Gruppe der DAMPs gehören. TLR 4 initiiert im Zusammenspiel mit CD14 und über die Ausschüttung von Zytokinen eine Immunantwort (46, 47). Die Immunantwort kann über mehrere Signalwege ablaufen. Zum einen wird eine Enzymkaskade ausgelöst, die Inflammasome aktiviert (45). Inflammasome sind intrazelluläre Proteingebilde (16), die unter anderem die Reifung von pro-IL-1 β zu IL-1 β durch die Caspase 1 regulieren (16). Im Folgenden rekrutiert IL-1 β als pro-inflammatorischer Mediator Immunzellen und aktiviert diese

(48–50). Zusätzlich kommt es bei einer Aktivierung der TLR4-Rezeptoren zur Induktion des *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) und somit zur verstärkten Expression von Genen, die proinflammatorische Zytokine kodieren (44). Durch diese beschriebenen Mechanismen kann Alkohol Einfluss auf das Immunsystem nehmen. So konnte von Hörauf *et al.* gezeigt werden, dass die Aktivität der Caspase 1 durch die Wirkung von Alkohol auf humane HepG2-Zellen signifikant gemindert wird (51). Ebenso konnte in weiterführenden Studien von Mörs *et al.* gezeigt werden, dass Alkohol hemmenden Einfluss auf den nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg hat (52).

Die veränderte Immunmodulation zeigt sich auch an den Monozyten. Bisherige Studien zeigen bereits, dass sowohl deren Anzahl als auch ihre Funktion unter dem Einfluss von Alkohol verändert sind (38, 53). Die Monozyten zirkulieren frei im Blut und exprimieren auf ihrer Oberfläche PRRs wie den TLR4. Wie zuvor beschrieben, können Monozyten im Falle einer Infektion PAMPs erkennen und entzündliche Zytokine ausschütten, welche die Immunantwort modulieren. Sie können aber auch vom Blut in das Gewebe einwandern und sich zu Makrophagen differenzieren (54). Die Monozyten können anhand ihrer Oberflächenproteine in drei verschiedene *Subsets* unterteilt werden: Die klassischen Monozyten (CD14^{bright}CD16⁻), die intermediären Monozyten (CD14^{bright}CD16⁺) und die nicht-klassischen Monozyten (CD14^{dim}CD16⁺). Dabei können sich die klassischen zu den intermediären und die intermediären zu den nicht-klassischen differenzieren (55). Die einzelnen *Subsets* unterscheiden sich in ihren jeweiligen Funktionen: Dabei nehmen die klassischen Monozyten mit ihren Fähigkeiten zur Adhäsion an das Endothel, zur Migration und Phagozytose vor allem eine Rolle in der antimikrobiellen Reaktion des Körpers ein (55). Die intermediären Monozyten zeigen die stärkste Präsentation von Antigenen auf ihrer Oberfläche und können sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine ausschütten. Die nicht-klassischen Monozyten hingegen zeigen vor allem bei der antiviralen Immunantwort eine erhöhte Aktivität (55). Sie werden mit Krankheitsgeschehen wie venösen Thromboembolien und Leberzirrhose assoziiert (56, 57). Zusätzlich spielen sie eine Rolle bei der Wundheilung (58). Der potenzielle Einfluss einer Alkoholintoxikation auf die Monozyten-Subtypen wurde zuvor noch nicht untersucht.

Die Relevanz der durch Alkohol bedingten Schwächung des Immunsystems lässt sich am Beispiel des Traumas verdeutlichen: Kommt es zu einer Verletzung,

setzen die betroffenen Zellen DAMPs frei (59, 60). Ebenso kommt es durch potenziell beschädigte Darm- oder Hautbarrieren zum Eindringen von PAMPs in den Organismus (60, 61). DAMPs und PAMPs binden an PRRs und induzieren so die Produktion und Freisetzung von Zytokinen (62, 63). Die proinflammatorische Immunantwort auf die DAMPs und PAMPs wird als *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS) bezeichnet. Die natürliche physiologische und zeitgleich ablaufende anti-inflammatorische Immunantwort wird als *Compensatory Anti inflammatory Response Syndrome* (CARS) bezeichnet (60). Sowohl eine Intensivierung des CARS als auch des SIRS kann zu Organversagen und Sepsis führen (60, 63). Die Auswirkungen des Alkoholkonsums auf dieses sensible Gleichgewicht sind unterschiedlich. Dabei spielen auch Unterschiede zwischen akutem und chronischem Alkoholkonsum eine Rolle (64). Es wurde festgestellt, dass alkoholisierte Traumapatienten mit einem chronischen Alkoholkonsum eine erhöhte Letalität im Trauma aufweisen und anfälliger für MODS und Sepsis als nicht alkoholisierte Patienten sind. Andererseits konnte gezeigt werden, dass akut alkoholisierte Traumapatienten im Vergleich zu chronisch trinkenden oder nicht alkoholisierten Traumapatienten ein verbessertes 24-Stunden-Überleben haben (64–66). In Tierversuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei akut alkoholintoxikierten Nagern die Mortalität nach einem hämorrhagischen Schock im Vergleich zu nüchternen Nagern stark reduziert war (67). Die Ursachen für die Veränderungen in deren *Outcomes* sind nicht zulänglich erforscht worden – vor allem nicht im humanen Szenario.

Vor dieser hohen klinischen Relevanz ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit die multiplen Auswirkungen des Alkoholkonsums auf das Immunsystem gesunder Probanden in einem Wirk-Zeit-Verhältnis zu beschreiben. Ebenso soll dargestellt werden, ab welcher Dosierung der Alkoholkonsum Einfluss auf das Immunsystem nimmt und ob die Höhe der BAC dabei mit den Auswirkungen auf das Immunsystem korreliert. Hierbei wurden mehrere Thematiken bearbeitet:

In der Arbeit von Sturm *et al.* wurde durch die Analyse von Biomarkern, die mit Störungen der Darmbarriere assoziiert sind, die Wirkung des Alkoholkonsums auf die Integrität der Darmbarriere analysiert. Zum anderen wurden Rückschlüsse auf die Endotoxinbioaktivität gezogen (68).

Zusätzlich beschäftigt sich die Arbeit von Haag *et al.* mit den Auswirkungen des Alkoholkonsums auf Anzahl und Funktion der Leukozyten im Gesamten und der Monozyten und Granulozyten im Speziellen. Um die Funktion der Zellen darzustellen, wurden ihre Apoptoseaktivität, ihre Fähigkeiten ROS zu bilden und Phagozytose zu betreiben beobachtet (69).

Ergänzend wurden die Monozyten in der Arbeit von Janicova *et al.* auf ihre Fähigkeit, an Lungenepithelzellen zu adhären sowie die Verteilung ihrer *Subsets* und deren Expression von TLR4 untersucht. Ebenfalls wurden die Serumspiegel von IL-1 β und die Aktivität der Caspase 1 als Indikator der Inflammation in Monozyten erfasst (70).

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

In den vorliegenden Arbeiten wurden zwölf weibliche und zehn männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 37 Jahren untersucht. Nach erfolgreicher Einholung des Ethikvotums mit der Nummer 255/14 am Universitätsklinikum der Goethe Universität Frankfurt wurde die Studie unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes und der STROBE Richtlinien durchgeführt (71). Die Probanden erhielten zu Beginn eine Pizza (Ø: 28cm) als standardisierte Mahlzeit. Danach erhielten sie über einen Zeitraum von vier Stunden jeweils alle 20 Minuten eine vorher mithilfe der Widmark-Formel berechnete Menge eines *Whiskey-Cola*-Mischgetränkes, um eine BAC von 1‰ nach vier Stunden zu erreichen (72). Die Getränke bestanden aus *Tennessee Whiskey Jack Daniels* 40% und *Coca-Cola* in einem Mischungsverhältnis von 1:2. Während des Versuchs stand den Probanden zusätzlich zu dem Mischgetränk noch ein Liter Wasser zur Verfügung. Die Blutentnahmen erfolgten vor dem Alkoholkonsum (T0), zwei Stunden (T2), vier Stunden (T4), sowie sechs Stunden (T6) nach Beginn des Konsums über eine Venenverweilkanüle mit 20 G (Vasofix Braunüle, Braun, Melsungen Germany). Ebenso wurde an beiden Folgetagen (T24 und T48) Blut abgenommen. Es erfolgten BAC Kontrollen über das Zentrallabor der Universitätsklinik. Zusätzlich wurde zu den Zeitpunkten T0 bis T6 Urin von den Probanden gesammelt, zentrifugiert und eingefroren. Für den Allgemeinen Versuchsaufbau siehe auch Abb. 1.

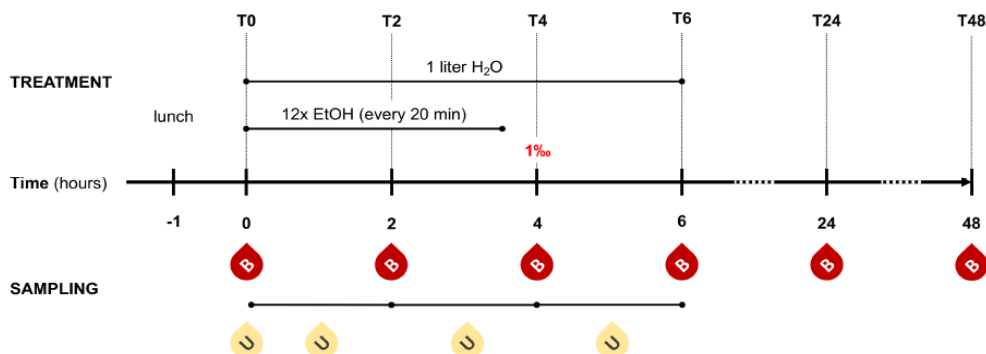


Abbildung 1: Allgemeiner Versuchsaufbau: Der Alkoholkonsum startete nach einer standardisierten Mahlzeit bei T-1 (eine Stunde vor dem Beginn des Alkoholkonsums). Zu den genannten Zeitpunkten (T0: Beginn des Alkoholkonsums, T2: zwei Stunden nach Beginn, T4: vier Stunden nach Beginn, T6: sechs Stunden nach Beginn, T24: 24 Stunden nach Beginn, T48: 48 Stunden nach Beginn) erfolgten Blutentnahmen (B). Am ersten Versuchstag wurde zwischen den Blutentnahmen der Urin der Probanden gesammelt und asserviert (U) (68).

5.2 FACS Analysen

Mithilfe der Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated Cell Sorting*: FACS) wurde die Phagozytoseaktivität (*Escherichia coli* (Stamm K-12) BioParticles™, Invitrogen, USA), ROS-Produktion (CM-H2DCFDA, Invitrogen, USA, und Apoptose-Aktivität (FAM-FLICA® Caspase-3/7 Assay Kit, ImmunoChemistry, Bloomington, USA) der untersuchten Zellen bestimmt. Ebenso wurde mit dieser Methode die Verteilung der Monozyten-Subsets anhand ihrer CD14- (APC/Cy7; Clone M5E2; BioLegend) und ihrer CD16-Antikörper (PE/Cy7; Clone 3G8; BioLegend), sowie ihre Caspase 1-Aktivität (FLICA 660 Caspase-1 Assay; ImmunoChemistry, USA) und TLR4-Expression (APC; Clone HTA125; BioLegend) bestimmt. Dafür wurde Heparinblut der Patienten mit den entsprechenden Markern inkubiert. Die genauen Beschreibungen der angewandten Methoden und Materialien für die durchflusszytometrischen Analysen sind den Publikationen zu entnehmen (69, 70).

5.3 ELISA Analysen

Mithilfe des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden im Serum der Probanden die Konzentrationen von IL-1 β (#DY201, R&D, USA), sCD14 (#DY383, R&D Systems, Minneapolis, USA), Syndecan-1 (#DY2780, R&D Systems, Minneapolis, USA) und FABP-I (#DY3078, R&D Systems, Minneapolis, USA) ermittelt. Ergänzend wurden die Konzentrationen von Syndecan-1 und FABP-I aus dem Urin der Probanden bestimmt. Die verwendeten Testkits sowie die genauen Methodenbeschreibungen sind den Publikationen im Anhang zu entnehmen (68, 70).

5.4 Adhäsionsversuch

Für die Adhäsionsversuche wurden Monozyten aus Heparin-Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation (Bicoll-Trennlösung, 1,077 g/ml Dichte; Biochrom, Deutschland) isoliert und anteilig mit 1 μ g/ml LPS (*E. coli* O127:B8 strain; Sigma Aldrich) über 90 Minuten stimuliert. Die CD14 positiven Zellen wurden weiter über magnetische Zellseparation unter Verwendung von Miltenyi-Säulen (Miltenyi Biotec, Deutschland) isoliert, in Nährmedium gelöst und auf 6-Loch Platten (Sarstedt, Deutschland), die mit A549-Zellen bewachsen waren (mind. \geq 95% Konfluenz), ausgebracht. Nach einer 35-minütigen Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit 1% Glutaraldehyd fixiert. Die adhärenen Monozyten wurden dann in fünf

verschiedenen Feldern einer definierten Größe ($5 \times 0,25 \text{ mm}^2$) mit einem Phasenkontrastmikroskop (20-fache Vergrößerung) gezählt. Die mittlere zelluläre Adhäsionsrate wurde berechnet. Die genaue Beschreibung der angewandten Methode und der verwendeten Materialien ist der Publikation zu entnehmen (70).

5.5 Statistische Auswertung

Zur Durchführung der statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA) verwendet. Die Daten werden als Median \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Zum Vergleich der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit einem Dunn's-Post-Hoc-Test angewandt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die jeweils angewandte statistische Methode ist den Publikationen zu entnehmen (68–70).

6 Ergebnisse

6.1 Blutalkohol

Während der Versuche stieg die Blutalkoholkonzentration ab T2 im Vergleich zu T0 signifikant an ($p < 0,05$, Abb. 2A). Nach vier Stunden (T4) war die Zielkonzentration von 1‰ bei beiden Geschlechtern erreicht (Abb. 2B). An den beiden Folgetagen (T24, T48) konnte kein Alkohol im Blut nachgewiesen werden (Abb. 2).

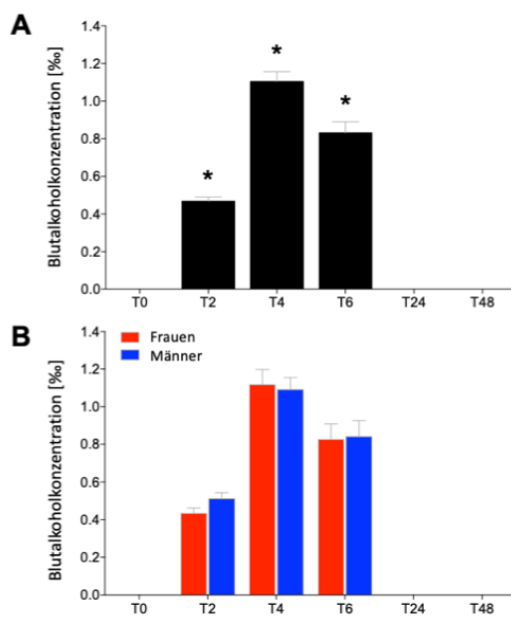


Abbildung 2: Verlauf der Blutalkoholkonzentration: Die Abbildungen zeigen die Blutalkoholkonzentration der Probanden zu den Zeitpunkten T0 bis T48. Die BAC wurde bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. Abbildung A zeigt die Gesamtprobanden, während Abbildung B die Kurven für weibliche (rot) und männliche (blau) Probanden separat darstellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 (68).

6.2 Darmintegrität

In dem untersuchten Serum der Probanden zeigte sich zu den Zeitpunkten T2 und T4 ein signifikanter Abfall der FABP-I Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert bei T0, der in einen signifikanten Anstieg an T6 überging ($p < 0,05$, Abb. 3A). Die geschlechtsspezifische Analyse zeigte an T2 signifikant höhere Spiegel bei Männern als bei Frauen ($p < 0,05$, Abb. 3B). Im Urin zeigte sich bei den Gesamtprobanden ein signifikanter Abfall des FABP-I-Spiegels bei T4 gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 3C).

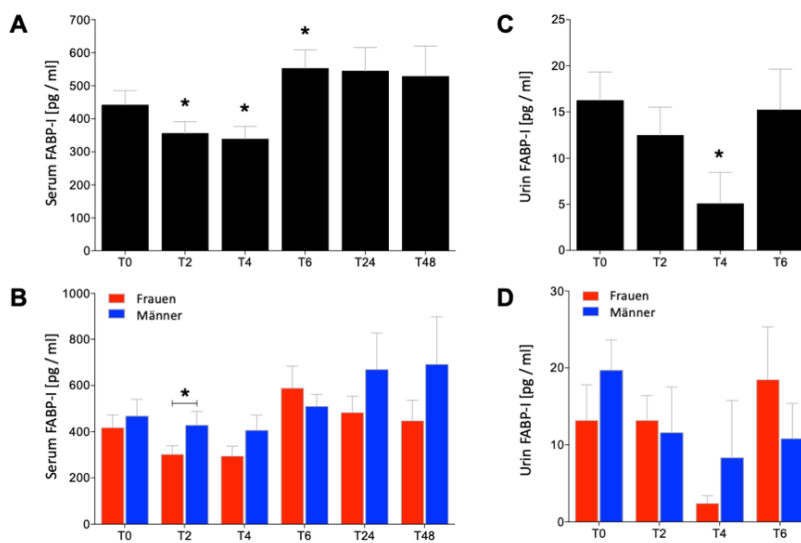


Abbildung 3: Verlauf der intestinalen Fatty Acid Binding Protein (FABP-I) Konzentrationen: Dargestellt sind die Konzentrationen von FABP-I im Serum (A, B) und Urin (C, D). Sie wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. Die Abbildungen A und C zeigen die Konzentrationen bei der gesamten Kohorte, die Abbildungen B und D stellt die weiblichen (rot) und männlichen (blau) Probanden separat dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (68).

Bei der Messung des Syndecan-1 zeigten sich im Serum bei der Gesamtpopulation keine signifikanten Änderungen (Abb. 4A). Jedoch zeigten sich bei den männlichen Probanden über alle beobachteten Zeitpunkte hinweg höhere Serumspiegel (Abb. 4B). Im Urin zeigte sich bei den Gesamtprobanden an T4 eine signifikante Abnahme des Syndecan-1 Spiegels im Vergleich zu T0 ($p < 0,05$, Abb. 4C). Die männlichen Probanden hatten zu jedem beobachteten Zeitpunkt signifikant höhere Spiegel von Syndecan-1 im Urin ($p < 0,05$, Abb. 4D).

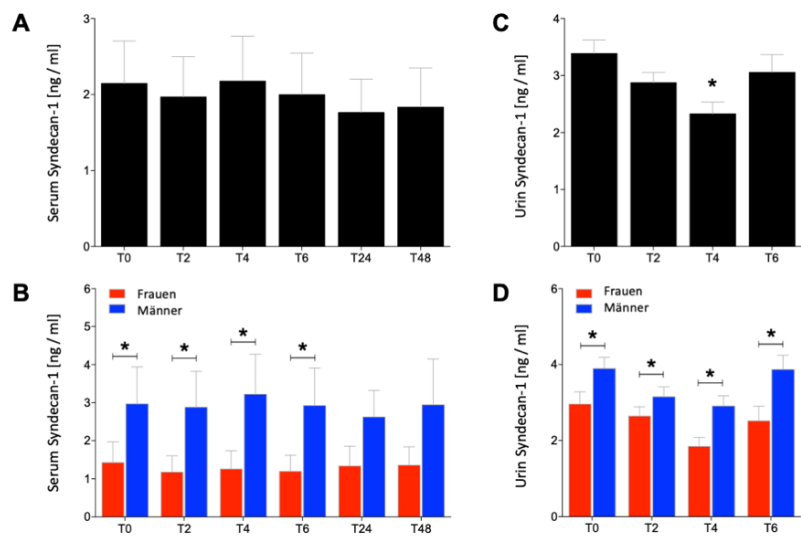


Abbildung 4: Verlauf der Syndecan-1 Konzentrationen: Es sind die Konzentration von Syndecan-1 im Serum (A, B) und im Urin der Probanden (C, D) dargestellt. Sie wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. A und C zeigen die Konzentrationen bei der gesamten Patientenkohorte, die Abbildungen B und D stellt die weiblichen (rot) und männlichen (blau) Probanden separat dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (68).

Über alle beobachteten Zeitpunkte hinweg zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des sCD14-Spiegels im Serum, der bezogen auf T0 bei T6, T24 und T48 signifikant war ($p < 0,05$, Abb. 5A). Bei der separaten Betrachtung der Geschlechter

zeigten sich bei T0 signifikant höhere sCD14-Spiegel bei den weiblichen Probanden ($p < 0,05$, Abb. 5B).

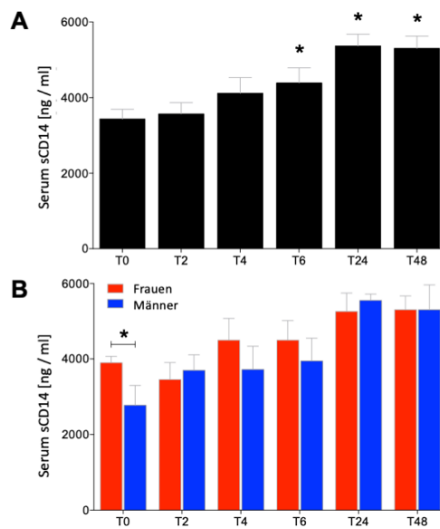


Abbildung 5: Verlauf der Konzentration von löslichem (soluble) Cluster of Differentiation 14 (sCD-14) bei gesunden Probanden: Die Konzentrationen wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. A zeigt die Konzentrationen bei der gesamten Patientenkohorte, Abbildungen B stellt die weiblichen (rot) und männlichen (blau) Probanden separat dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 (68).

Darüber hinaus ergab sich eine positive Korrelation zwischen den Serum sCD14 Werten bei T24 mit den FABP-I Werten bei T2 ($p < 0,05$, Abb. 6)

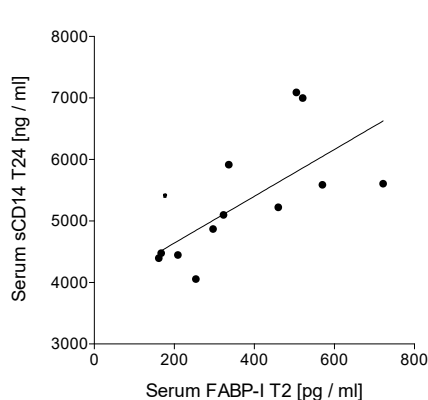


Abbildung 6: Spearman-Analyse der Korrelation zwischen dem löslichem (soluble) Cluster of Differentiation 14 (sCD14) und dem intestinalen Fatty Acid Binding Protein (FABP-I): Es wird eine positive Korrelation mit einem Spearman $r = 0,8182$ zwischen dem zirkulären FABP-I bei 2 Stunden (T2) und sCD14 bei 24 Stunden nach Beginn der Alkoholaufnahme gezeigt ($p < 0,05$, $n = 12$) (68).

Zusammenfassend lässt der Anstieg des FABP-I-Spiegels auf eine Störung der Darmintegrität durch den Alkohol schließen. Da dieser bei den weiblichen Probanden weniger stark ausgeprägt war, kann davon ausgegangen werden, dass diese in einem geringeren Ausmaß von der Schädigung betroffen waren. Der kontinuierliche Anstieg der sCD14-Konzentration im Serum lässt auf eine erhöhte Translokation von Mikroorganismen nach Alkoholabusus bei beiden Geschlechtern schließen und unterstreicht die Annahme, dass ein erhöhter Alkoholkonsum zu einer Schädigung der Darmbarriere beiträgt.

6.3 Zellzahl

Die Gesamtzahl der Leukozyten stieg an T2 und T4 signifikant gegenüber dem Ausgangswert T0 an ($p < 0,05$, Abb. 7A). Mit gleichzeitig fallender BAC nahm die Anzahl der Leukozyten an T6 wieder ab (Abb. 7A). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Abb. 7B). Der Anteil der Granulozyten nahm bei T4 und T6 signifikant im Verhältnis zu T0 ab ($p < 0,05$, Abb. 7C). Zu den meisten betrachteten Zeitpunkten hatten die weiblichen Probanden eine geringere Anzahl an Granulozyten als die männlichen. Dieser Unterschied war bei T48 signifikant ($p < 0,05$, Abb. 7D). Zwei Stunden nach der Beendigung des Trinkens (T6) nahm die Anzahl der Monozyten signifikant ab, an beiden Folgetagen war sie signifikant gegenüber ihres ursprünglichen Niveaus (T0) erhöht ($p < 0,05$, Abb. 7E).

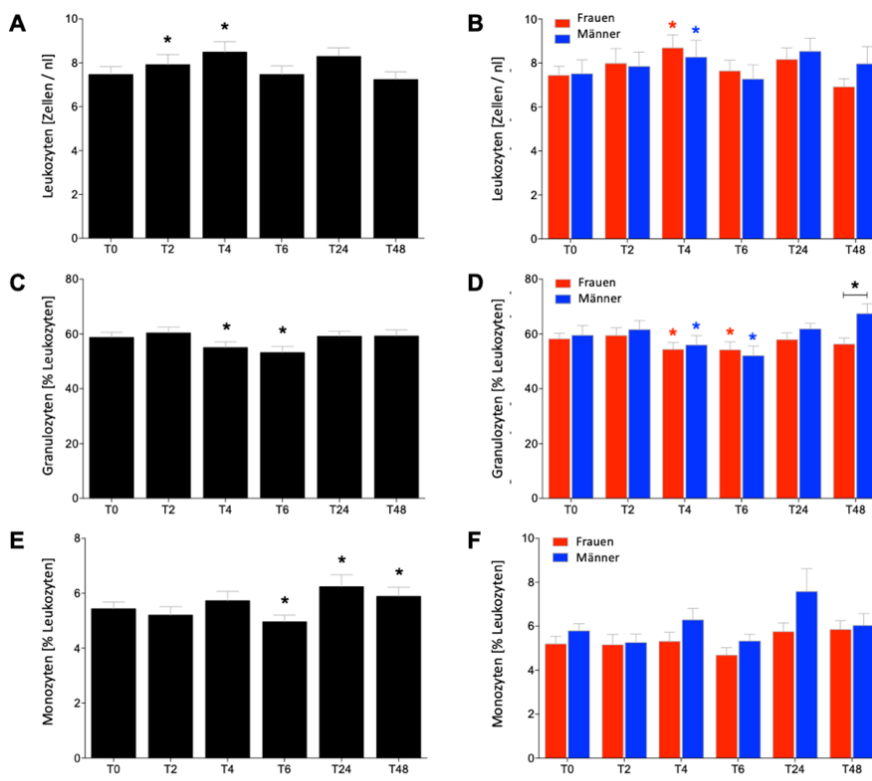


Abbildung 7: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Anzahl der Zellen des angeborenen Immunsystems bei gesunden Probanden: Anzahl der Gesamtleukozyten (A, B), Anteil der Granulozyten (C, D) sowie der Monozyten (E, F) wurde aus dem Blut von 12 weiblichen und 10 männlichen Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. Die Ergebnisse werden sowohl in der Gesamtpopulation (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Weibliche Probanden sind durch den roten und männliche durch den blauen Balken repräsentiert. Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (69).

Über alle beobachteten Zeitpunkte hinweg zeigten sich keine signifikanten quantitativen Änderungen der Anzahl der CD14 positiven Monozyten. Die klassischen Monozyten ($CD14^{bright}CD16^{-}$) zeigten zu T2 und T24 signifikante Anstiege im Vergleich zu T0 ($p < 0,05$, Abb. 9B). Die intermediären Monozyten ($CD14^{bright}CD16^{+}$) zeigten zu den Zeitpunkten T2 bis T6 signifikante Anstiege gegenüber ihrer Ausgangswerte bei T0 und fielen an den Folgetagen wieder auf ihr jeweils ursprüngliches Niveau zurück

($p < 0,05$, Abb. 9C). Die nicht-klassischen Monozyten ($CD14^{dim}CD16^+$) zeigten vier und sechs Stunden nach Beginn des Alkoholkonsums signifikante Anstiege gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 9D).

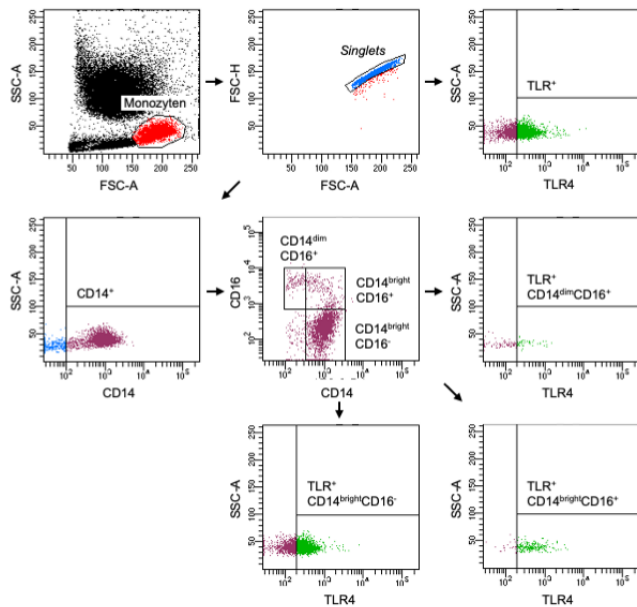


Abbildung 8: Repräsentative Gating Strategie der Monozyten (70).

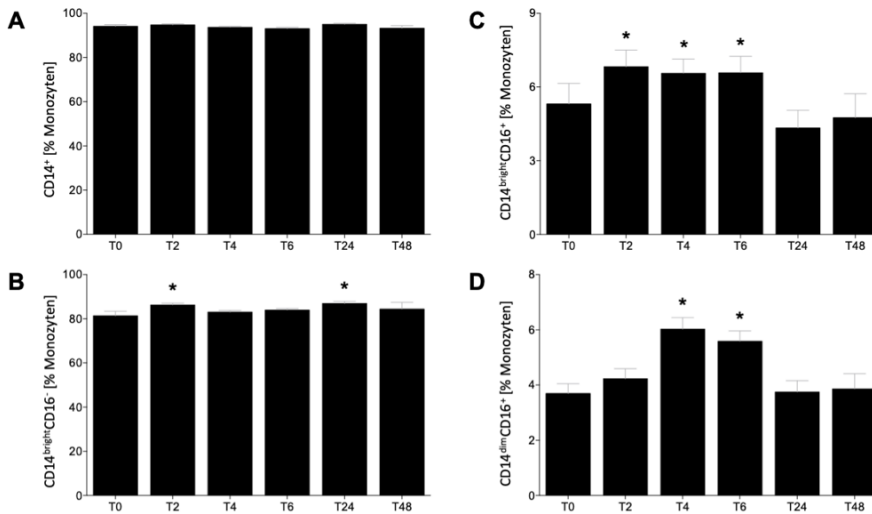


Abbildung 9: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Verteilung der Monozyten-Subsets bei gesunden Probanden: Die prozentuale Verteilungen von Cluster of Differentiation 14 positiven ($CD14^+$) (A), klassischen ($CD14^{bright}CD16^-$) (B), intermediären ($CD14^{bright}CD16^+$) (C) und nicht-klassischen ($CD14^{dim}CD16^+$) (D) Monozyten wurde aus dem Blut von 22 gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. * : $p < 0,05$ vs. T0 (70).

Durch den Alkohol kam es insgesamt zu einem initialen Anstieg der Gesamtleukozytenzahl, dem ein Abfall der Granulozytenzahl (T4, T6) und der Monozytenzahl (T6) folgte. Auch die Monozyten-Subsets reagierten auf den Alkoholkonsum. Zuerst stiegen die klassischen Monozyten an (T2), gefolgt von den intermediären (T2-T6) und zuletzt den nicht-klassischen Monozyten (T4, T6) (Abb. 7 und Abb. 9).

6.4 TLR4 Expression und Signalübertragung der Monozyten

Die CD14 positiven Zellen mit TLR4-Expression zeigten einen signifikanten Anstieg von T0 zu T2 und fielen danach wieder auf das Ausgangsniveau ab. Am zweiten Folgetag (T48) zeigten signifikant weniger Zellen TLR4-Expression als zu Beginn des Versuchs (T0) ($p < 0,05$, Abb. 10A). Zu T2 und T6 zeigten signifikant mehr klassische Monozyten die Expression von TLR4 im Vergleich zu T0, während die intermediären und nicht-klassischen Monozyten an T2 einen signifikanten Anstieg zeigten ($p < 0,05$, Abb. 10B, C, D). Ebenfalls wurden die Monozyten auf die Intensität der TLR4-Expression untersucht. Die Intensität wird im Folgenden als *Mean Fluorescence Units* (MFU) angegeben. Dabei zeigten die CD14 positiven Zellen im Gesamten eine signifikant stärkere Expression an T2 im Vergleich zu T0 ($p < 0,05$, Abb. 10E). Die klassischen Monozyten zeigten von T2 bis T6 einen ansteigenden Trend in der Expressionsstärke; und am ersten Folgetag (T24) einen signifikanten Abfall gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 10F). Die intermediären Monozyten zeigten an beiden Folgetagen (T24 und T48) eine signifikant abgeschwächte Expression von TLR4 im Vergleich zum Expressionslevel vor dem Versuch ($p < 0,05$, Abb. 10G). Währenddessen zeigten die nicht-klassischen Monozyten nach zwei Stunden (T2) einen signifikanten Anstieg der TLR4-Expression gegenüber dem Ausgangswert (T0), die im Anschluss wieder auf ein nicht signifikantes Niveau abfiel ($p < 0,05$, Abb. 10H).

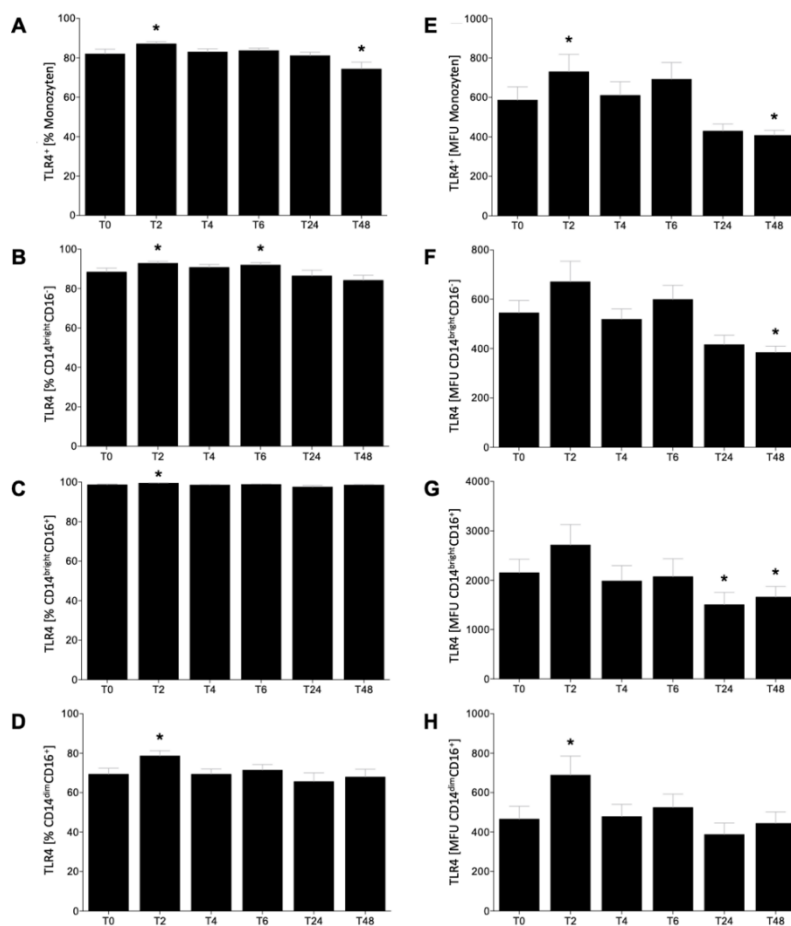


Abbildung 10: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Oberflächenpräsentation des Toll-like Receptors 4 (TLR4) auf den Monozyten von gesunden Probanden: Prozentuale und mittlere Intensität der Expression von TLR4 auf Cluster of Differentiation 14 positiven (CD14⁺) (A und E), klassischen (CD14^{bright}CD16⁺) (B und F), intermediären (CD14^{bright}CD16⁺) (C und G) und nicht-klassischen Monozyten. (CD14^{dim}CD16⁺) (D und H) Die Monozyten-Subsets wurden aus dem Blut von 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach Beginn des Alkohol-konsums bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 (T0).

Die Aktivität der Caspase 1 in den CD14 positiven Monozyten erwies sich über den beobachteten Zeitraum als konstant. Eine *ex vitro* durchgeführte Stimulation mit LPS zeigte zu allen beobachteten Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der Caspase 1 Aktivität und eine signifikant höhere Aktivität im Vergleich zum nicht-stimulierten Zustand ($p < 0,05$, Abb. 11B).

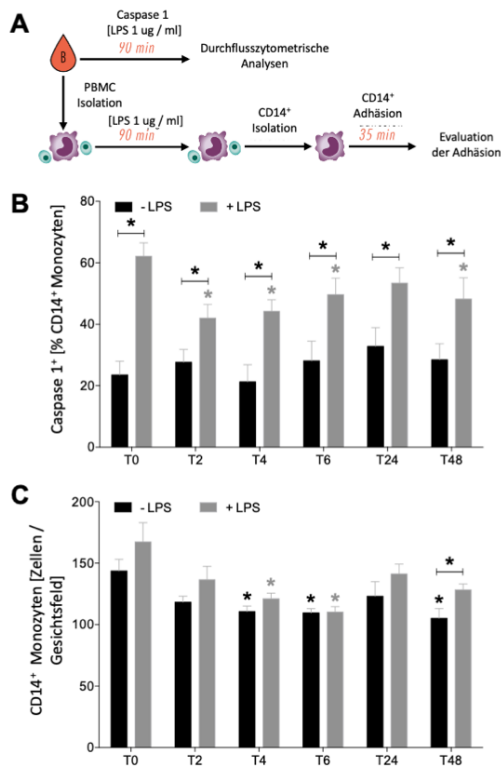


Abbildung 11: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Inflammasom-Aktivierung von Monozyten und deren Adhäsionsfähigkeit nach *ex vivo* Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS): A zeigt die Beschreibung des Versuchsaufbaus. Ebenfalls dargestellt sind die prozentuale Expression von Caspase 1 in CD14⁺-Monozyten (B) und deren Adhäsionsfähigkeit nach *ex vivo* LPS-Stimulation (C) bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums. Die Daten sind als Median \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (T0).

Die IL-1 β Spiegel im Serum von Probanden lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Daher wurden die Vollblutproben mit LPS stimuliert und IL-1 β im Überstand gemessen. Am Versuchstag selbst übte der Alkoholkonsum keinen Einfluss auf die Spiegel von IL-1 β aus. Allerdings zeigten sich am jeweils ersten Folgetag ein dezenter und am zweiten Folgetag ein signifikanter Abfall des IL-1 β -Spiegels gegenüber dem Ausgangswert T0 ($p < 0,05$, Abb. 12A). Ebenso konnte eine positive Korrelation zwischen den IL-1 β Spiegeln nach Vollblutstimulation mit LPS und der Intensität der TLR4-Expression auf den CD14-positiven Monozyten gezeigt werden (Abb. 12B).

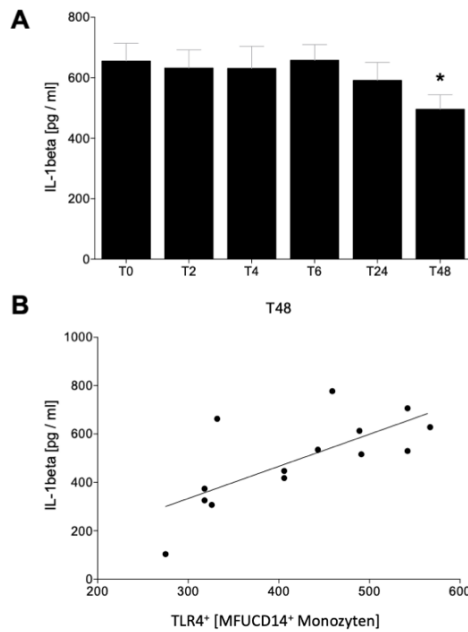


Abbildung 12: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Interleukin (IL)-1 β -Sekretion im Serum gesunder Probanden: Der Serumspiegel von IL-1 β wurde im Blut von 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt (A). B zeigt die Spearman-Analyse der Korrelation zwischen IL-1 β und der Expression des Toll-like Receptors 4 auf den Monozyten bei T48. Die Daten sind als Median \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 (T0).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es durch den Alkoholkonsum zu einer vermehrten Expression von TLR4 mit einer erhöhten Rezeptordichte auf den Monozyten der untersuchten Probanden kommt (u.a. T2). Die IL-1 β Freisetzung zeigt sich bis auf eine signifikante Reduktion am zweiten Folgetag (T48) bei gleichbleibender Caspase 1-Aktivität unverändert.

6.5 Phagozytose-Aktivität

Nach dem Erreichen der maximalen BAC war der Anteil der phagozytierenden Leukozyten an T4 und T6 signifikant vermindert gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 13A). Während des gesamten Experiments hatten die weiblichen Probanden im Vergleich zu den männlichen Probanden einen geringeren Anteil an den phagozytierenden Leukozyten. Dieser Unterschied erwies sich bei T48 als signifikant ($p < 0,05$, Abb. 13B). Die Intensität der phagozytierenden Leukozyten zeigte über den gesamten Messzeitraum hinweg keine signifikanten Änderungen (Abb. 14A). Die Leukozyten der weiblichen Probanden zeigten beinahe zu jedem Zeitpunkt eine höhere Intensität als die der männlichen Probanden. Dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern war bei T2 signifikant ($p < 0,05$, Abb. 14B).

Der Anteil der phagozytierenden Granulozyten blieb während des Experiments konstant. Eine Ausnahme bildete T24, hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Phagozytoseaktivität gegenüber der Ausgangsaktivität bei T0 ($p < 0,05$, Abb. 13C).

Über den Versuchstag hinweg zeigte sich eine stetige Zunahme der Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten. Bei den weiblichen Probanden war die Intensität der phagozytierenden Granulozyten zu jedem Zeitpunkt, außer bei T24, höher als bei den männlichen Probanden. Dieser Unterschied war zwei Stunden nach Alkoholkonsum signifikant ($p < 0,05$, Abb. 14C, D).

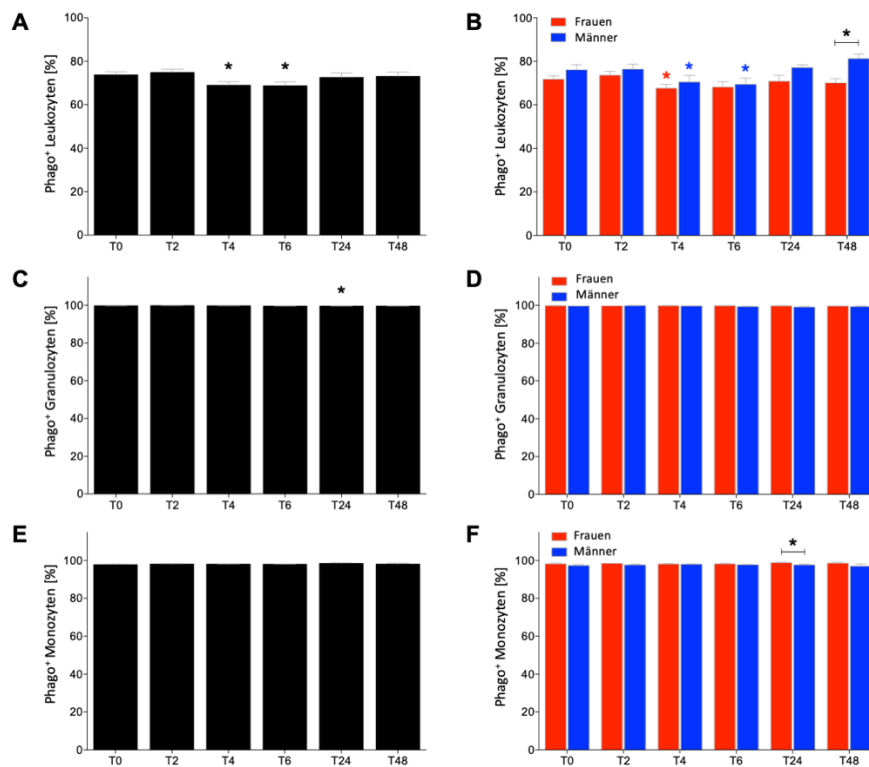


Abbildung 13: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf den Anteil phagozytierender Leukozyten (A, B), Granulozyten (C, D) und Monozyten (E, F) bei gesunden Probanden: Messungen der Phagozytose positiven Zellen (phago⁺) wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums durchgeführt. Ergebnisse sind sowohl in der Gesamtpopulation (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Dabei werden die weiblichen Probanden durch den roten und die männlichen durch den blauen Balken repräsentiert. Die Daten sind als Median \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (69).

Der Anteil der phagozytierenden Monozyten blieb während der gesamten Studie auf einem konstanten Niveau (Abb. 13E). Am ersten Folgetag (T24) zeigte sich der Anteil der phagozytierenden Monozyten bei den weiblichen Probanden signifikant höher als bei den männlichen ($p < 0,05$, Abb. 13F). Zwei Stunden nach Erreichen der maximalen BAC (T6) fiel die Intensität der phagozytierenden Monozyten signifikant ab ($p < 0,05$, Abb. 14E). Allgemein zeigte sich bei den weiblichen Probanden die Intensität der phagozytierenden Monozyten zu jedem Zeitpunkt höher als bei den männlichen Probanden. Dieser Geschlechterunterschied war bei T0, T2 und T48 signifikant ausgeprägt ($p < 0,05$, Abb. 14F).

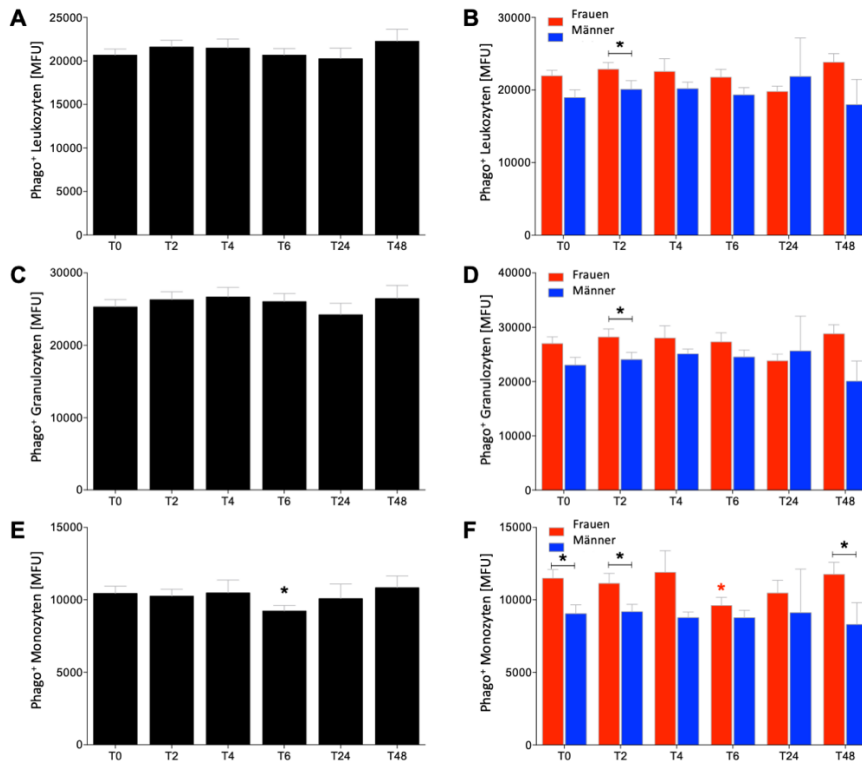


Abbildung 14: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Phagozytose von Leukozyten (A, B), Granulozyten (C, D) und Monozyten (E, F) bei gesunden Probanden: Die Analysen der mittleren Fluoreszenzeinheiten (MFU) als Kapazitätsmaß für die Phagozytose wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0) und 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach Beginn des Alkoholkonsums durchgeführt. Die Ergebnisse sind sowohl in der Gesamtpopulation (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Weibliche Probanden sind durch den roten und die männlichen durch den blauen Balken repräsentiert. Die Daten sind als Median \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (69).

Zusammenfassend nahm durch den Alkoholkonsum die Anzahl der phagozytierenden Gesamtleukozyten bei gleichbleibender Intensität ab (T4, T6). Die Anzahl der phagozytierenden Granulozyten zeigte sich am ersten Folgetag signifikant gegenüber T0 gemindert. Es ließ sich demonstrieren, dass die untersuchten Zellen der weiblichen Probanden zu den meisten Zeitpunkten aktiver Phagozytose betrieben als die der männlichen.

6.6 ROS-Produktion

Die Intensität der ROS-produzierenden Leukozyten nahm nach Beginn des Alkoholkonsums bei T2 signifikant gegenüber T0 ab. Vier Stunden nach Beginn des Alkoholkonsums bei T4 stieg die Fluoreszenzintensität wieder signifikant gegenüber dem Ausgangswert an. Nach Beendigung des Konsums (T6) fiel die Intensität wieder signifikant im Vergleich zu T0 ab ($p < 0,05$, Abb. 15A).

Die Fluoreszenzintensität der ROS-produzierenden Granulozyten zeigte sich nach Erreichen der maximalen BAC bei T4 und T6 in der Gruppe aller Probanden im Vergleich zu T0 signifikant reduziert ($p < 0,05$, Abb. 15C). Bei separater Betrachtung der Geschlechter zeigte sich die Intensität bei den weiblichen Probanden bei T2 bis T24 im Vergleich zu T0 signifikant gemindert ($p < 0,05$, Abb. 15D).

Die Intensität der ROS-produzierenden Monozyten war zu T24 bei den Gesamtprobanden gegenüber dem Ausgangswert (T0) signifikant vermindert ($p < 0,05$, Abb. 15E).

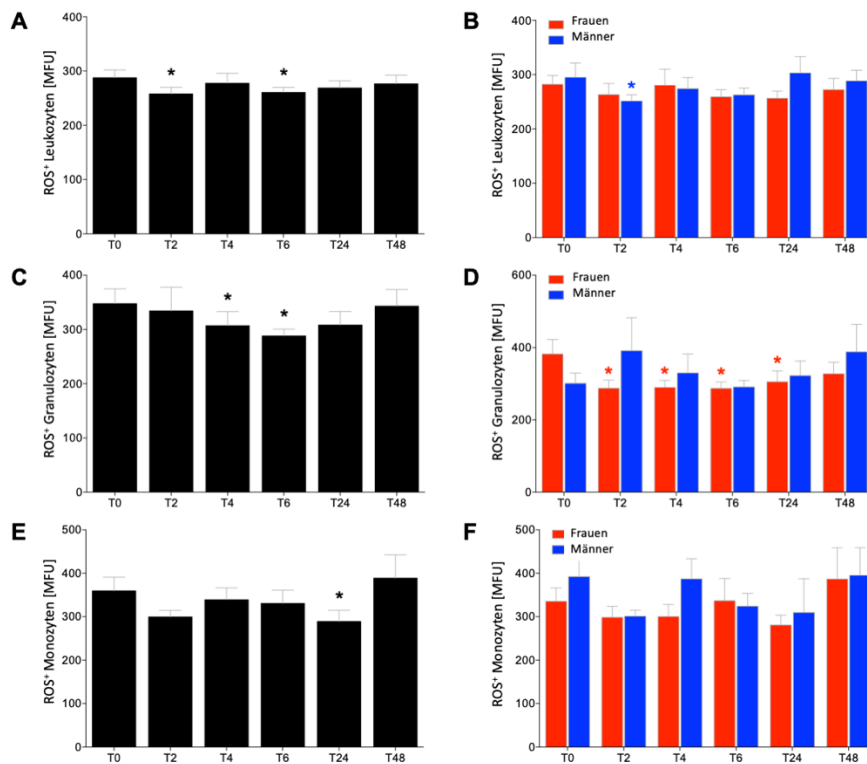


Abbildung 15: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Leukozyten (A, B), Granulozyten (C, D) und Monozyten (E, F) bei Probanden: Die Intensität der ROS produzierenden Zellen wurden bei 12 weiblichen und 10 männlichen Probanden vor (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums durchgeführt. Die Ergebnisse sind sowohl in der Gesamtpopulation (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Weibliche Probanden sind durch den roten und männliche durch den blauen Balken repräsentiert. Daten sind als Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFU) \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 (69).

Zusammenfassend wurde die Intensität der ROS-Produktion durch den Einfluss des Alkoholkonsums verringert. Diese Auswirkungen waren bis zu den Folgetagen nachweisbar.

6.7 Apoptoseaktivität

Der Anteil der Caspase 3/7 positiven Leukozyten erhöhte sich bei T2 signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Zu den folgenden Zeitpunkten sank der Anteil der Caspase 3/7 positiven Leukozyten im Vergleich zum Ausgangswert T0 auf ein nicht-signifikantes Niveau ($p < 0,05$, Abb. 16A). Die Fluoreszenzintensität der untersuchten Leukozyten nahm bei T2 signifikant gegenüber T0 zu. Dieser Anstieg war sowohl bei der Gesamtheit der Probanden als auch bei den weiblichen Probanden signifikant ($p < 0,05$, Abb. 17A+B).

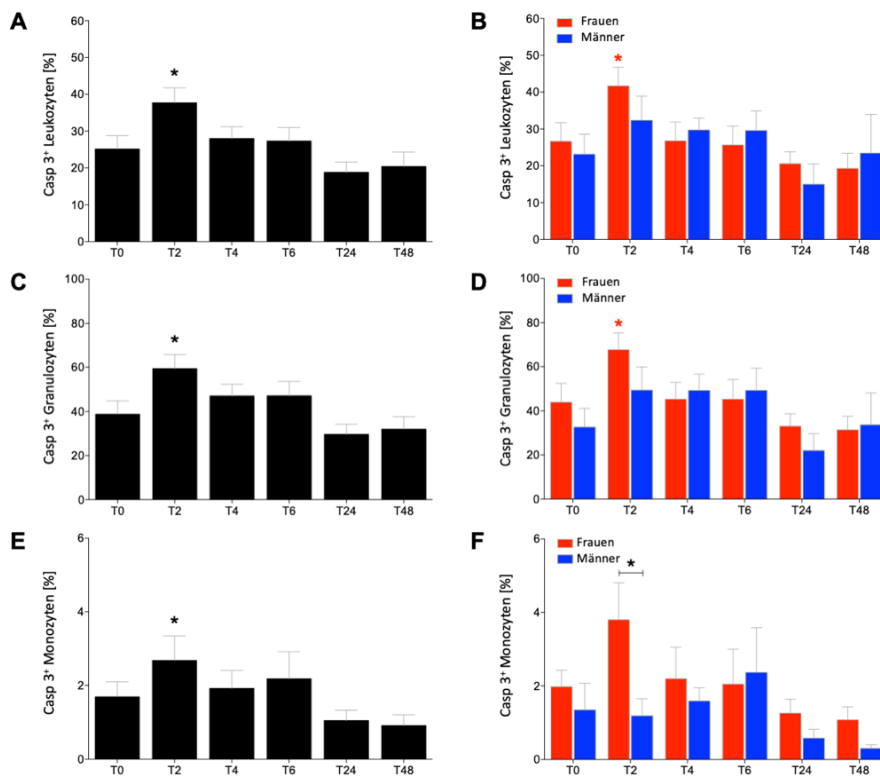


Abbildung 16: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf den Anteil der apoptotischen Leukozyten (A, B), Granulozyten (C, D) und Monozyten (E, F) bei gesunden Probanden: Als Indikator für die Apoptose wurden die Caspasen 3/7 verwendet. Bestimmung der Caspase 3/7 positiven Zellen (Casp 3+) wurde bei 12 weiblichen und 10 männlichen Probanden vor (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach Beginn des Alkoholkonsums durchgeführt. Die Ergebnisse sind sowohl in der Gesamt-population (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Weibliche Probanden sind durch den roten und die männlichen durch den blauen Balken repräsentiert. Daten sind als Median \pm Standardfehler des Mittel-werts angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (69).

Der Anteil der Caspase 3/7 positiven Granulozyten zeigte sich bei T2 signifikant gegenüber T0 erhöht und fiel zu den folgenden Zeitpunkten wieder ab ($p < 0,05$, Abb. 16C). Ebenso nahm die Fluoreszenzintensität in den untersuchten Granulozyten bei T2 signifikant gegenüber T0 zu und fiel danach wieder auf ein nicht-signifikantes Niveau ab ($p < 0,05$, Abb. 17C).

Der Anteil der Caspase 3/7 positiven Monozyten stieg zwei Stunden nach Beginn des Alkoholkonsums (T2) signifikant gegenüber dem Ausgangswert an ($p < 0,05$, Abb. 16E). Hier bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem erhöhten Anteil bei den weiblichen Probanden und dem unveränderten Anteil an Caspase 3/7 positiven Monozyten bei den männlichen ($p < 0,05$, Abb. 16F). Bei T4 nahm der Anteil der Caspase 3/7 positiven Monozyten ab und blieb für die nächsten Zeitpunkte auf nicht-signifikantem Niveau (Abb. 16E). Die Fluoreszenzintensität in den Caspase 3/7 positiven Monozyten stieg während des gesamten Experiments an. Zwei Stunden nach Erreichen der maximalen BAC (T6) war dieser Anstieg für die weiblichen Probanden gegenüber dem Ausgangswert signifikant ($p < 0,05$, Abb. 17F). An dem ersten Folgetag (T24) war der Anstieg der Intensität der Caspase 3/7 positiven Monozyten bei allen betrachteten Probanden signifikant gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 17E). Bei T48 nahm die Intensität im Vergleich zu T0 bei den Gesamtprobanden und

bei den männlichen Probanden im Einzelnen signifikant zu. Der Unterschied zwischen den Intensitäten bei den weiblichen und männlichen Probanden bei T48 war signifikant ($p < 0,05$, Abb. 17F).

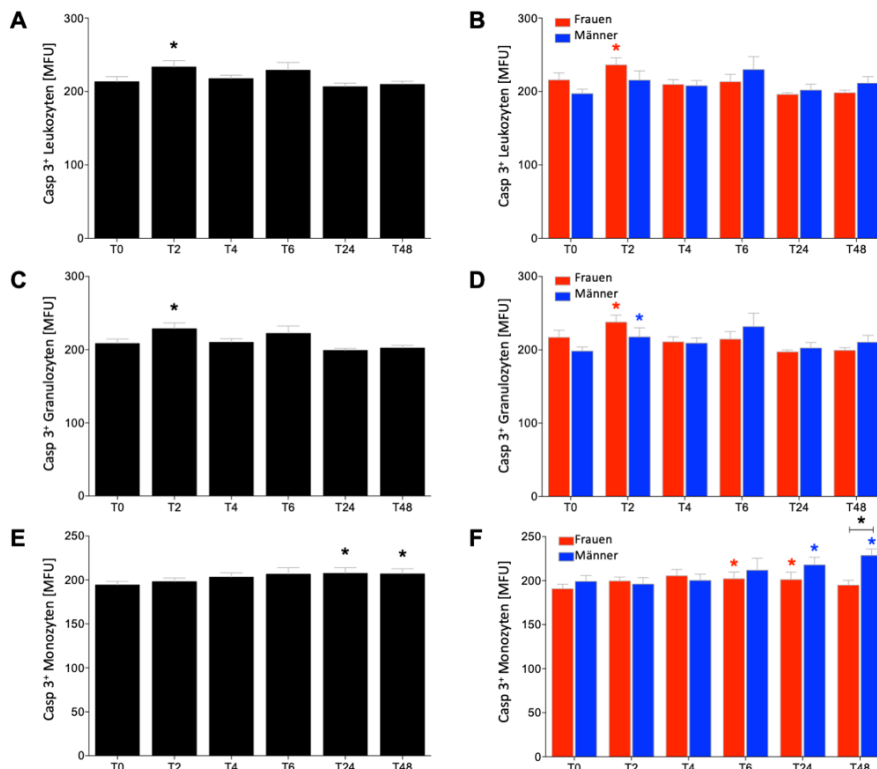


Abbildung 17: Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Intensität der Apoptose von Leukozyten (A, B), Granulozyten (C, D) und Monozyten (E, F) bei gesunden Probanden: Als Indikator für die Apoptose wurden die Caspasen 3/7 verwendet. Mittlere Fluoreszenzeinheiten (MFU), wurden als Maß für die Apoptoseaktivität der Zellen, bei 12 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden vor (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) und 48 Stunden (T48) nach dem Beginn des Alkoholkonsums bestimmt. Ergebnisse sind in der Gesamtpopulation (A, C, E) als auch nach Geschlechtern getrennt (B, D, F) dargestellt. Weibliche Probanden sind durch den roten und die männlichen durch den blauen Balken repräsentiert. Daten sind als der Median \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. *: $p < 0,05$ vs. T0 oder $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen (69).

Zusammenfassend ließ sich bei T2 ein Anstieg der Apoptoseaktivität in allen betrachteten Zellen nachweisen. Der Alkohol zeigte demnach eine frühe proapoptotische Wirkung, die bei den Monozyten auch noch an beiden Folgetagen vorhanden war.

6.8 Adhäsionsverhalten der Monozyten

Die CD14-positiven Monozyten zeigten an allen beobachteten Zeitpunkten eine gegenüber der Ausgangssituation verminderte Adhäsion. Die Ausprägung bei T4, T6 und T48 war signifikant gegenüber T0. Ebenso zeigte sich die Fähigkeit zur Adhäsion auch unter LPS-Stimulation gemindert. Diese Minderung war zu den Zeitpunkten T4 und T6 signifikant gegenüber T0 ($p < 0,05$, Abb. 11C).

7 Diskussion

Der gegenwärtige Stand der Forschung legt nahe, dass Alkoholkonsum Toleranzen gegenüber DAMPs und PAMPs induziert (67). Dadurch ist die Funktion des Immunsystems eingeschränkt und es reagiert nicht adäquat auf Moleküle wie beispielsweise bakterielles Endotoxin (42, 53). Als Konsequenz werden durch Monozyten und neutrophile Granulozyten weniger ROS freigesetzt. Ebenso ist die Phagozytoseaktivität reduziert und die Expression der Caspasen 3 und 7 verstärkt, was auf verstärkte Apoptosevorgänge hinweist (53, 73–77). Auch ist die Invasion von Mikroorganismen in die Zirkulation durch eine geschwächte Darmbarriere erleichtert (78). Kommt es vor diesem Hintergrund beispielsweise zu einem Trauma, kann dies zu verlängerten Hospitalisierungszeiten und zu einer erhöhten Gesamtmortalität führen (64). Da Alkoholkonsum laut WHO ein weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem darstellt und mit diversen Krankheitsgeschehen assoziiert ist, haben diese Auswirkungen eine hohe klinische Relevanz (1).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die vielfältigen Auswirkungen von kontinuierlichen, über mehrere Stunden verteilten hohen Alkoholkonsum auf das angeborene Immunsystem gesunder Probanden. Dabei wurden Monozyten und neutrophile Granulozyten im Hinblick auf ihre Fähigkeit, ROS zu bilden und Phagozytose zu betreiben, sowie ihrer Apoptoseaktivität beobachtet. Zusätzlich betrachtet wurde die Adhäsion der Monozyten an A549-Zellen. Damit wurde aufgezeigt in welchem Ausmaß, zu welchem Zeitpunkt und ab welcher Dosis die Zellen der angeborenen Immunantwort durch Alkohol in ihrer Funktionalität beeinträchtigt waren. Ebenso sollten genauere Erkenntnisse über die sowohl pro- als auch die anti-inflammatorischen Effekte des Alkohols gewonnen werden. Zusätzlich beschäftigt sich die Arbeit mit der Auswirkung des Alkoholkonsums auf die Expression von TLR4 auf den CD14-positiven Monozyten, die Aktivität der Caspase 1 und die Konzentration von IL-1 β im Serum, um die Effekte des Alkohols auf Inflammasomfunktionalität und -aktivierung darzulegen. Ebenso wurde die Verteilung der Monozyten *Subsets* untersucht, um auf diese Weise ebenfalls Erkenntnisse über Auswirkungen des Alkoholkonsums auf sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zelltypen zu sammeln. Des Weiteren wurde die Auswirkung von Alkohol auf die Darmintegrität als mögliche Ursache für eine Schwächung der Darmbarriere beschrieben. Diese könnte

eine Eintrittspforte für mögliche Erreger darstellen und Ursache für systemische Komplikationen werden (16).

7.1 Alkohol reduziert die Darmintegrität und steigert die Endotoxinbioaktivität

In vorangegangenen Studien konnten Anton *et al.* zeigen, dass der Konsum von Alkohol die Integrität der Darmbarriere stört und so das Eindringen von Erregern in den Organismus ermöglicht. Dafür fütterten sie Ratten über vier Tage mit Alkohol und analysierten deren lymphatisches Gewebe auf ein erhöhtes Vorkommen von Erregern sowie die Struktur der *tight junction* Proteine im Darm. Dabei konnten Anton *et al.* eine strukturelle Schädigung der *tight junctions* und eine erhöhte bakterielle Translokation nachweisen (78). Diese alkoholbedingten Veränderungen spielen beispielsweise im Trauma eine wichtige Rolle (48). So können PAMPs, die durch die geschädigte Darmbarriere in den Organismus eindringen, die Entstehung einer Sepsis begünstigen und das *Outcome* des Patienten negativ beeinflussen (60). Vor diesem Hintergrund wurden auch die Auswirkungen des Alkoholkonsums von gesunden Probanden auf ihre Darmbarriere beobachtet. Um die Integrität des Darmes zu bestimmen, wurden FABP-I und Syndecan-1 im Serum und Urin der Probanden bestimmt. Ebenso wie die sCD14-Konzentration, um die Translokation von Mikroorganismen bewerten zu können.

FABP-I wurde bereits von Montagnana *et al.* in ihrem Review als möglicher Marker für Darmischämie assoziierte Darmschädigungen diskutiert (21). Zusätzlich konnten Oldenburger *et al.* erhöhte FABP-I-Serumspiegel bei Kindern mit Zölliakie nachweisen, die mit dem Untergang von Darmgewebe assoziiert sind (79). In bisherigen klinischen Studien konnten erhöhte FABP-I-Serumspiegel bei Traumapatienten mit intestinalen Verletzungen im Vergleich zu Traumapatienten mit anderen Verletzungsmustern nachgewiesen werden (20). Im vorliegenden Versuchsaufbau nahm die FABP-I Konzentration im Serum initial signifikant ab und an T6 wieder zu (68). Der Anstieg bei T6 lässt auf eine alkoholinduzierte Schädigung der Darmbarriere bei den gesunden Probanden schließen. Die initiale Abnahme des Serum-FABP-I ist durch die vorangegangene Nahrungsaufnahme und die dadurch reduzierte Darmmotilität sowie den verlangsamten Transport des Alkohols in den Darm zu erklären. Der FABP-I-Anstieg an T6 war bei den männlichen Probanden stärker ausgeprägt, weshalb davon auszugehen ist, dass die beschriebenen Auswirkungen

bei Frauen weniger stark ausgeprägt sein könnten (68). Zu diesen Ergebnissen passt, dass Edogawa *et al.* mithilfe eines Saccharid-Ausscheidungstests zeigen konnten, dass gesunde Frauen eine geringere Darmpermeabilität haben als gesunde Männer (80). Gegen die dargelegte Interpretation sprechen hingegen die Ergebnisse von Asai *et al.*, die mithilfe von Zellkulturen zeigen konnten, dass ein erhöhter Östradiolspiegel, wie er physiologisch nur bei Frauen vorkommt, die alkoholinduzierte Apoptose intestinaler Epithelzellen verstärkt (81). Allerdings sind hier die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren, da es sich um ein reines *in vitro* Model handelte. Es sind weitere Versuche notwendig, um die abweichenden Auswirkungen von Alkohol auf die unterschiedlichen Geschlechter in diesem Zusammenhang genauer darzustellen. Die beschriebenen Ergebnisse des Serum-FABP-I zeigen, dass Alkohol die Darmintegrität vor allem am Tag des Konsums beeinträchtigt. An den Folgetagen konnten keine Auswirkungen nachgewiesen werden (68). In einem vergleichbaren Kontext konnte bereits bei Mäusen mehrfach eine schädigende Wirkung von vermehrtem Alkoholkonsum auf die Darmintegrität beschrieben werden. So konnten Tang *et al.* eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmbarriere bei chronisch alkoholisierten Mäusen zeigen (82). Klingensmith *et al.* konnten chronischen Alkoholkonsum bei Mäusen mit Sepsis mit einer erhöhten Apoptose der Epithelzellen des Darmes in Verbindung bringen (17). Auch Voigt *et al.* konnten an Mäusen mit chronischem Alkoholkonsum eine Schädigung der Darmbarriere nachweisen (18). Die beschriebenen Ergebnisse erweitern die bereits vorhandenen um die Erkenntnis, dass der Darm nicht direkt zu Beginn des Konsums geschädigt wird. Welche Rolle potenzielle Modifikationen des Mikrobioms hierbei spielen ist noch immer unbekannt.

Als weiteren Marker für die Darmintegrität wurden die Konzentrationen von Syndecan-1 im Serum und Urin gemessen (68). Syndecan-1 ist ein Oberflächenprotein der Epithelzellen des Darms (25). Eine Erhöhung des Syndecan-1 im Serum konnte im Mausversuch mit dem Verlust der *tight junctions* und einer Dysfunktion des Darmepithels assoziiert werden (27). Die weiblichen Probanden zeigten signifikant niedrigere Syndecan-1 Spiegel in Serum und Urin (68). Diese niedrigeren Werte zeigten sich bereits vor dem Alkoholkonsum (T0) (68), weshalb die Daten indizieren, dass Frauen generell einen niedrigeren Syndecan-1-Serumspiegel haben als Männer. Dieser geschlechterspezifische Unterschied wurde bereits in von Huxley *et al.* beschrieben (83). Die unveränderten Syndecan-1-Spiegel stehen im Kontrast zu den

erhöhten FABP-I-Werten bei T6. Es konnte also keine Freisetzung von Syndecan-1 aus den Zellen des Darmepithels nachgewiesen werden. Ergänzend wären hier weitere Studien sinnvoll. Ein Ansatz wäre, die Probanden eine Lösung mit schwer resorbierbaren Zuckern trinken zu lassen und deren Konzentration im Urin zu bestimmen. Würden diese Zucker ausgeschieden werden, könnte von einer vermehrten Aufnahme über den Darm und einer damit verbundenen Darmschädigung ausgegangen werden. Eventuell wäre es möglich, die Ausprägung der Schädigung in diesem Versuchsaufbau besser einschätzen zu können und den Verdacht auf eine funktionelle Schädigung der Darmbarriere zu erhärten. Ein anderer möglicher Ansatz wäre, das Mikrobiom der Patienten zu untersuchen, da ein gestörtes Mikrobiom mit einem Verlust der Darmintegrität assoziiert sein kann und ebenfalls durch den Konsum von Alkohol verändert ist (84).

Das ebenfalls gemessene sCD-14 stellt einen Indikator für die mikrobielle Translokation dar und kann mit einer Erhöhung der Entzündungsparameter assoziiert werden (28). Die Serumkonzentration von sCD-14 stieg über den kompletten Zeitraum an. Dieser Anstieg zeigte sich insbesondere an T6, T24 und T48 (68). Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau konnten auch Bala *et al.* einen Anstieg der sCD-14-Konzentration im Serum gesunder Probanden zeigen. Dafür ließen sie diese einmalig Alkohol trinken und bestimmten dann im weiteren Verlauf in regelmäßigen Abständen die sCD14-Konzentrationen im Serum (85). Dieser Anstieg lässt auf eine erhöhte Translokation von Mikroorganismen aus dem Darm in die Zirkulation schließen. Dass die sCD14-Spiegel an den Folgetagen signifikant erhöht sind, unterstreicht die nachhaltigen Auswirkungen eines einmaligen Alkoholkonsums auf den Organismus. Neben den Auswirkungen auf die Darmbarriere zeigt sich die Wirkung des Alkohols auch an Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die zum angeborenen und antigenunspezifischen Teil des menschlichen Immunsystems gehören (86).

7.2 Alkoholkonsum zeigt einen frühen pro- und einen späten anti-inflammatorischen Effekt auf die Anzahl der Leukozyten

Mithilfe der durchflusszytometrischen Analysen wurde die Anzahl der Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten bestimmt. Ein vermindertes Ansprechen dieser Zellen auf Stimuli wie DAMPs und PAMPs ist im Falle einer Infektion mit einer erhöhten Inzidenz an Komplikationen sowie einer erhöhten

Mortalität assoziiert (35–37). Haag *et al.* zeigten einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen in den ersten vier Stunden nach dem Alkoholkonsum. Nach sechs Stunden fiel die Zellzahl wieder auf das Ausgangsniveau zurück (69). Diese anfänglich stimulierende Wirkung von Alkohol passt zu den Ergebnissen von Afshar *et al.* Sie zeigten eine frühe pro-inflammatorische Phase 20 Minuten nach einem einmaligem, hohen Alkoholkonsum, bei dem gesunde Probanden ebenfalls eine BAC von 1‰ erreichten (38). Dieser initiale Anstieg der Leukozyten in der Zirkulation lässt sich durch die alkoholbedingt verringerten Adhäsionsraten, die ebenfalls in der Arbeit von Janicova *et al.* gezeigt wurden, erklären (70). Durch die verringerte Adhäsion ist die Migration der Leukozyten aus der Zirkulation erschwert und die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten nimmt vorerst zu (69). Auf den anfänglichen Anstieg der Anzahl der Leukozyten folgt eine Abnahme der Monozytenzahl (T6) und der neutrophilen Granulozytenzahl (T4 und T6) (69). Diese Abnahmen können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in der Arbeit von Haag *et al.*, begleitend zu dem frühen pro-inflammatorischen Effekt, ebenfalls eine erhöhte Apoptoseaktivität zu Beginn des Konsums (T2) gezeigt werden konnte (69). Des Weiteren stellt die anti-inflammatorische Wirkung des Alkohols eine logische Erklärung für eine Verminderung der Anzahl der zirkulierenden Immunzellen dar. Dieser Effekt konnte bereits u.a. in weiteren Studien nachgewiesen werden, die in Maus- und Zellversuchen eine verminderte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine unter Alkoholeinfluss beschreiben konnten (52, 67). Diese verminderte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen könnte eine verringerte Rekrutierung von Immunzellen bedingen. Unsere Erkenntnisse stimmen mit dem oben beschriebenen Modell von Afshar *et al.* überein, welches eine frühe inflammatorische Phase gefolgt von einer anti-inflammatorischen als Reaktion auf den Alkoholkonsum beschreibt (38). Die Zahl der zirkulierenden Leukozyten steigt also initial durch eine frühe pro-inflammatorische Wirkung des Alkohols und eine verminderte Migration aus der Zirkulation an, nimmt allerdings durch gleichzeitig erhöhte Apoptoseraten im Verlauf wieder ab. Dieser suppressive Effekt von Alkohol auf die neutrophilen Granulozyten in der Zirkulation konnte ebenfalls in einer klinischen Studie gezeigt werden, in der alkoholisierte kritisch kranke Patienten ohne traumatischen Unfallmechanismus untersucht wurden (87). Die bereits diskutierten Apoptoseraten wurden im Weiteren über die Aktivität der Caspasen 3/7 betrachtet (69). Sie sind mit der Apoptose assoziiert, eine Erhöhung ihrer Expression lässt auf verstärkte Apoptosevorgänge schließen (88).

7.3 Alkohol vermittelt einen frühen Anstieg der Apoptose in Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Die Arbeit von Haag *et al.* zeigte einen signifikanten Anstieg der Caspasen 3/7-exprimierenden Immunzellen bei T2 und damit auch einen Anstieg der Apoptoseaktivität. Dies betraf alle untersuchten Zelltypen. Die Leukozyten und die neutrophilen Granulozyten wiesen zusätzlich zu einer vermehrten Expression auch eine signifikant erhöhte Intensität der Caspasen 3/7 auf (69). Das bedeutet, dass nicht nur deutlich mehr Zellen Apoptoseaktivität aufwiesen, sondern dass diese in den einzelnen Zellen auch verstärkt ausgeprägt war. Somit konnte gezeigt werden, dass Alkohol einen frühen pro-apoptotischen Effekt auf Leukozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten hat. Bei den Monozyten zeigte sich zusätzlich zu der frühen Apoptose auch eine signifikant erhöhte Intensität der Caspasen 3/7 an beiden Folgetagen (69). Die erhöhte Intensität zeigt an, dass die Caspasen 3/7 in den einzelnen Zellen verstärkt exprimiert werden und somit auch die pro-apoptotischen Prozesse innerhalb dieser Zellen verstärkt sind. Die Zunahme der Apoptoseaktivität manifestiert sich in einer signifikanten Abnahme der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (zu T4 und T6) und der Monozyten (zu T6) in der Zirkulation (69). Die pro-apoptotische Wirkung des Alkoholkonsums auf Zellen des Immunsystems ist bereits bekannt. So konnten beispielsweise Ivanova *et al.* eine erhöhte Apoptoseaktivität an Leukozyten zeigen, die sie aus dem Blut von gesunden Probanden isoliert und mit Ethanol stimuliert hatten (89). Ebenso konnten Hote *et al.* mithilfe von Zellkulturen den pro-apoptotischen Effekt einer Stimulation mit Ethanol auf CD4⁺ T-Zellen zeigen (90). Die vorliegende Arbeit von Haag *et al.* konnte nun zusätzlich nachweisen, dass die apoptotische Wirkung von Alkohol gleich zu Beginn des Konsums am stärksten ist (69). Das bedeutet, dass schon der Konsum von wenigen alkoholischen Getränken das menschliche Immunsystem schwächt, indem die Anzahl der Immunzellen durch die Induktion der Apoptose dezimiert wird. Die erhöhten Apoptoseraten zu T2 unterstreichen die bereits in dieser Arbeit ausgeführte Theorie, die eine frühe pro- und eine späte anti-inflammatorische Wirkung des Alkohols beschreibt (38). Ferner kann die Apoptose auch durch hohe ROS-Konzentrationen induziert werden (91–93). Passend dazu konnten *in vivo* Experimente an Ratten eine anti-apoptotische Wirkung von Alkohol in Kombination mit einer reduzierten ROS-Bildung zeigen (94). Die von uns bei T2 gezeigte erhöhte Apoptoseaktivität wurde begleitet von einer signifikanten Abnahme der Intensität der

ROS-produzierenden Leukozyten. Inwiefern dies allerdings eine Rolle bei der nachgewiesenen Apoptose spielt, ist fraglich. Die genaueren Abläufe in diesem Zusammenhang müssten in weiteren Studien untersucht werden. So könnten die Leukozyten von alkoholisierten Probanden auf die Aktivität der einzelnen, mit Apoptosevorgängen assoziierten Proteine analysiert werden. Auf diese Weise könnten tiefere Einblicke in intrazelluläre Regulationsmechanismen und den Einfluss von Alkohol auf diese gewonnen werden.

Zusätzlich zu der Anzahl von Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten sowie ihrer Apoptoseaktivität wurden auch die Auswirkungen des Alkohols auf die Monozyten und die Verteilung ihrer *Subsets* genauer untersucht.

7.4 Alkohol zeigt einen frühen pro- und einen späten anti-inflammatorischen Effekt auf die Monozyten-Subsets

Die Monozyten lassen sich entsprechend ihrer Oberflächenproteine in drei Subpopulationen einteilen: Die klassischen Monozyten (CD14^{bright}CD16⁻), die intermediären Monozyten (CD14^{bright}CD16⁺) und die nicht-klassischen Monozyten (CD14^{dim}CD16⁺). Dabei nehmen die klassischen Monozyten eine vor allem pro-inflammatorische Rolle ein. Sie migrieren vom Blut in das Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren und Phagozytose betreiben. Die intermediären Monozyten stellen eine Zwischenform dar, die ebenfalls pro-inflammatorisch aktiv ist. Sie weist die stärkste Antigenpräsentation auf und reguliert die Apoptose. Die nicht-klassischen Monozyten sind vor allem an der Komplement- und Fc-Gamma-vermittelten Phagozytose und Adhäsion beteiligt (55).

Der gezeigte initiale Anstieg der klassischen Monozyten nach zwei Stunden kann als kurzfristiger, pro-inflammatorischer Effekt des Alkohols interpretiert werden, wie er ebenfalls beim initialen Anstieg der Gesamtleukozyten gezeigt werden konnte. Im weiteren Verlauf fiel die Anzahl der klassischen Monozyten wieder auf ein nicht signifikantes Niveau. Stattdessen zeigten sich die intermediären und die nicht-klassischen Monozyten erhöht (70). Die Monozyten können von klassisch zu intermediär und von intermediär zu nicht-klassisch wechseln (55). Es ist davon auszugehen, dass es durch den Alkoholkonsum der Probanden zuerst zu einer Freisetzung von klassischen Monozyten aus dem Knochenmark kam, die sich dann in die mit einer raschen Immunantwort assoziierten (95), intermediären Monozyten

wandelten. Diese wiederum änderten sich dann über den längeren Einfluss der erhöhten BAC in die Form der eher anti-inflammatorischen nicht-klassischen Monozyten. Diese Änderung der Monozyten-Subsets zeigt somit auch eine frühe pro- und eine späte anti-inflammatorische Wirkung des Alkohols. Eine der wenigen anderen Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von Alkohol auf die Verteilung der Monozyten-Subsets beschäftigt, ist von Donnadiou-Rigole *et al.*. Sie untersuchten die Monozyten von alkoholabhängigen Patienten im Entzug und verglichen diese mit denen von gesunden Probanden. Dabei zeigte sich, dass der chronische Alkoholkonsum zu einer Abnahme der klassischen Monozyten und einer Zunahme der nicht-klassischen Monozyten führt (96). Diese Verschiebung korreliert mit derjenigen, die ebenfalls in der Arbeit von Janicova *et al.* in einem Model mit akutem Alkoholkonsum gezeigt werden konnte (70). Da sich chronischer und gelegentlicher Alkoholkonsum unterschiedlich auf die Kompetenz des Immunsystems auswirken (34), sind hier weiterführende Studien sinnvoll, die diese Unterschiede zwischen den beiden genannten Konsumtypen weiter untersuchen. Die betrachteten Monozyten wurden ebenfalls auf ihre TLR4-Expression, Caspase 1-Aktivität und IL-1 β -Ausschüttung untersucht, um ihre Funktionalität genauer darstellen zu können.

7.5 Alkoholkonsum induziert eine verstärkte Expression von TLR4 auf Monozyten bei gleichbleibender Caspase 1-Aktivität und reduzierter IL-1 β -Ausschüttung

Der TLR4 gehört zu den PRRs und wird hauptsächlich in Immunzellen wie Monozyten exprimiert, aber auch in einigen Nicht-Immunzellen wie Endothelzellen (44). Seine Rolle ist es, Antigene zu detektieren und eine pro-inflammatorische Immunantwort auszulösen (46). Des Weiteren konnten Li *et al.* zeigen, dass TLR4 auch eine Rolle in der Integrität der Darmbarriere spielt (97). So korrelierte in Versuchen mit Zellkulturen ein Anstieg der TLR4-Expression mit einer Unterbrechung der *tight junctions* zwischen den Epithelzellen von Kolon und Ileum (97). Dieser Zusammenhang stärkt die vorliegende Arbeit, in der Janicova *et al.*, eine verstärkte TLR4-Expression nachweisen konnten (70), während Sturm *et al.* einen Verlust der Darmbarriere beschreiben konnten (68). Die frühe pro-inflammatorische Reaktion auf den Alkoholkonsum wurde von einem Anstieg der TLR-4-Expression aller Monozyten begleitet. Ein Anstieg der Expression der TLR4 ist von Relevanz für die Immunreaktion des Organismus und lässt auf eine erhöhte Sensibilität der beobachteten Monozyten

schließen (46). Das wiederum lässt eine pro-inflammatorische Situation der Monozyten bei T2 vermuten. Im Widerspruch dazu konnten Janicova *et al.* und Haag *et al.* weder eine erhöhte Phagozytoseaktivität, noch eine erhöhte Adhäsionsbereitschaft oder eine erhöhte ROS-Produktion zu diesem Zeitpunkt feststellen (69, 70). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die erhöhte BAC auf einem anderen Signalweg anti-inflammatorisch Einfluss auf intrazelluläre Strukturen nehmen könnte und so eine Immunantwort auf Übermittlung der Signale der vermehrten TLR-4 Rezeptoren verhindert oder gar hemmt. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Entzündungsreaktion über den PI3K/AKT-Signalweg gehemmt werden kann (98). Passend zu dieser These konnten Muralidharan *et al.*, die ebenfalls mit Monozyten von gesunden Probanden arbeiteten, zeigen, dass die *in vitro* Behandlung dieser Zellen mit Alkohol die Signalkaskade vom TLR-4 über das *Myeloid Differentiation Primary Response 88* Protein (MyD88) und dem *Toll/interleukin-1 Receptor (TIR)-Domain-Containing Adapter-inducing Interferon- β* (TRIF) hemmt (99). So exprimieren Monozyten zwar verstärkt TLR4 an ihrer Oberfläche, durch die gehemmte Signalleitung kommt es aber trotzdem nicht zu einem Anstieg von Phagozytose und ROS-Bildung der Monozyten (69). Um diese Diskrepanz zwischen TLR4-Expression und anti-mikrobieller Aktivität der untersuchten Zellen genauer erklären zu können, wurde die IL-1 β -Konzentration, nach LPS-Stimulation, im Serum der Probanden bestimmt. IL-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und verursacht die Aktivierung von Immunzellen (48–50). Zusätzlich zu der IL-1 β -Konzentration wurde die Aktivität der Caspase 1 bestimmt. Diese maturiert die inaktive Vorstufe pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β , das aus den Monozyten in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Hierfür werden Caspase 1 und pro-IL-1 β -Synthese durch die Inflammasomen induziert. Das Inflammasom ist ein Enzymkomplex, der als Reaktion auf DAMPs oder PAMPs über PRRs aktiviert wird (49). Unsere Versuche zeigten eine Abnahme der IL-1 β -Freisetzung nach LPS-Stimulation durch Alkoholkonsum. Diese korreliert positiv mit der TLR4-Expression. Die Menge an aktiver Caspase 1 in den Monozyten der Probanden änderte sich hingegen nicht (70). Die Tatsache, dass die Aktivität der Caspase 1 nicht verringert war, legt die Annahme nahe, dass das Inflammasom selbst nicht durch die Wirkung des Alkohols gehemmt wird. Wenn das Inflammasom gehemmt wäre, müsste die Aktivität der Caspase 1 ebenfalls reduziert sein (49). Demzufolge ist es naheliegend, dass die Sezernierung von IL-1 β aus der Zelle gestört ist. Da der Sezernierungsmechanismus von IL-1 β aus den Monozyten getrennt vom

Inflammasom reguliert wird (100), sind hier weiterführende Studien sinnvoll, die sich mit der Auswirkung des Alkohols auf die Sezernierung von IL-1 β beschäftigen. Zusätzlich zu der Synthese von IL-1 β in Monozyten ist dies auch in neutrophilen Granulozyten möglich (101). Ebenso konnten Provoost *et al.* in Versuchen mit *Knock-out*-Mäusen eine Inflammasom-unabhängige Produktion von IL-1 β nachweisen (102). Eine Hemmung dieser alternativen Synthesewege wäre in dem beschriebenen Versuchsaufbau nicht darstellbar gewesen und könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für den verringerten IL-1 β -Spiegel darstellen. Auch diese Theorie könnte Grundlage weiterer Studien sein. Die verringerte IL-1 β -Konzentration könnte daher eine Folge von alkoholinduzierten Toleranzen gegenüber Stimulierenden Faktoren sein.

7.6 Alkohol induziert Toleranzbildungen gegenüber PAMPs

Um die untersuchten Monozyten weiter auf Toleranzbildungen gegenüber PAMPs zu analysieren, wurden diese nach Isolation *ex vivo* mit LPS stimuliert. Durch die Stimulation zeigte sich zu allen beobachteten Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Menge an aktiver Caspase 1 (70). Dies beschreibt einen physiologischen Vorgang und zeigt, dass die untersuchten Zellen das Endotoxin erkennen und darauf mit einer Aktivierung der Inflammasome reagieren (49). Allerdings nahm diese Immunreaktion mit Beginn des Alkoholkonsums (von T0 zu T2) in den untersuchten Monozyten signifikant ab und war danach trotz steigender Tendenz über die Zeit des weiteren Konsums signifikant reduziert (70). Dies spricht für eine alkoholinduzierte Toleranzbildung der Monozyten gegenüber PAMPs, die auch bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (42, 99, 103). Hörauf *et al.* konnten ebenfalls an mit Ethanol vorbehandelten humanen Leberzellen, die sie mit Adenosintriphosphat (ATP) und LPS stimulierten, zeigen, dass eine kurzfristige Stimulation dieser Zellen mit Alkohol zu einer Herabregulation der Caspase 1-Expression führt (51). Dieser Effekt der Toleranzbildung konnte in der Arbeit von Janicova *et al.* nun auch an Monozyten von gesunden Probanden gezeigt werden (70). Eine mögliche Erklärung für diese Toleranzbildung ist der immunsuppressive Effekt des Alkohols auf die Monozyten, der durch eine verringerte IL-1 β -Freisetzung charakterisiert werden konnte (70). IL-1 β stellt einen wichtigen pro-inflammatorischen Mediator dar, der unter anderem auch die ROS-Bildung und Phagozytoseaktivität von Monozyten und neutrophilen Granulozyten reguliert (86). Vor diesem Hintergrund wurden weiterführend Leukozyten, Monozyten

und neutrophile Granulozyten auf ihre Fähigkeiten untersucht, ROS zu bilden und Antigene zu phagozytieren.

7.7 Alkohol verringert die ROS-Bildung und Phagozytose-Aktivität der Leukozyten

Die ROS-Bildung und die Phagozytose von Leukozyten bilden einen wichtigen Bestandteil in der Abwehr gegen Mikroorganismen. Diese Zellen sind in der Regel die ersten, die auf Krankheitserreger reagieren können und stellen somit einen wichtigen Bestandteil der Immunabwehr dar (86). Es ist bereits bekannt, dass eine verminderte Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten mit einem verschlechterten *Outcome* bei Patienten mit Sepsis korreliert (104). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Minderung von Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion mit Infektionen assoziiert ist (105, 106).

Bisherige Studien konnten eine Steigerung der ROS-Produktion nach Alkoholkonsum zeigen. So ergab sich eine erhöhte ROS-Produktion der Granulozyten bei den Versuchen von Stadelbauer *et al.*, die gesunden Probanden einmalig ein Vodka-Getränk verabreichten, um eine BAC von 1‰ zu erreichen (74). Ähnlich zeigten Vrsalovic *et al.* eine gesteigerte ROS-Produktion bei Granulozyten von gesunden Probanden, die sie isoliert und *ex vivo* mit Ethanol stimuliert hatten (107). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Parlesak *et al.*, die ebenfalls bei isolierten Granulozyten von gesunden Probanden ein vermindertes Ansprechen dieser auf LPS nach Behandlung mit Ethanol nachwiesen (53). Ebenso zeigte Alkohol bei den Versuchen von Dhindsa *et al.* keine signifikant steigernde Wirkung auf die ROS-Produktion der Monozyten und Granulozyten. Hierbei konsumierten die Probanden eine einmalige Menge eines Vodka-Getränks und erreichten damit circa 0,9‰, woraufhin im Anschluss die ROS-Produktion zu definierten Zeitpunkten bestimmt wurde (108). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsaufbau unterscheidet sich von den soeben beschriebenen. Wie bei Dhindsa *et al.* und Stadelbauer *et al.* wurden ebenfalls gesunde Probanden eingeschlossen. Allerdings wurde die BAC der Probanden kontinuierlich durch den regelmäßigen Konsum von alkoholischen Getränken über vier Stunden hinweg auf 1‰ gesteigert. So konnte der Verlauf der ROS-Produktion bei steigender BAC dargestellt werden. Die Gesamtleukozyten zeigen einen biphasischen Verlauf. Die Kapazität der ROS-Produktion der einzelnen Zellen zeigt sich zu den Zeitpunkten T2 und T6 signifikant verringert (69). Dies erlaubt

allerdings nur eingeschränkt eine Aussage über die Auswirkungen auf die Kompetenz zur spezifischen Abwehr von Mikroorganismen. So kann beispielsweise keine quantitative Darstellung der ROS insgesamt erfolgen. Ebenso kann nicht differenziert werden, ob die verringerte ROS-Produktion der einzelnen Zellen durch andere Zellen kompensiert wird. Hier könnten weiterführend *Killing Assays* durchgeführt werden, bei denen die Fähigkeit der Leukozyten Mikroorganismen direkt abzutöten, genauer bestimmt wird. Hierfür würden die zu untersuchenden Zellen mit vitalen Mikroorganismen inkubieren werden. Im Anschluss könnte beobachtet werden, ob die Zellen dazu in der Lage sind, diese Mikroorganismen abzutöten, indem deren Wachstum bestimmt wird. Die von Haag *et al.* ebenfalls beobachteten Monozyten zeigten eine ähnliche Tendenz wie die Gesamtleukozyten. Allerdings zeigte sich hier nur an den Folgetagen eine signifikante Einschränkung der ROS-Produktion durch die Wirkung des Alkohols. Bei den beobachteten neutrophilen Granulozyten zeigte sich eine verminderte Intensität der ROS-Produktion zu T4 und T6. Ebenso war es bemerkenswert, dass die Intensität der ROS-positiven neutrophilen Granulozyten der weiblichen Probanden zu den Zeitpunkten T2 bis T24 signifikant unter der der männlichen lag (69). Dies legt nahe, dass diese Zellen bei den weiblichen Patienten besonders in ihrer ROS-Produktion eingeschränkt sind. Diese Tatsache sollte Anlass dafür bieten, auch zukünftig die Geschlechter gesondert auf die Auswirkungen von Alkoholkonsum zu untersuchen.

Als weiteren Bestandteil der mikrobiellen Abwehr wurde die Fähigkeit der Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten Antigene zu phagozytieren untersucht.

Dabei erwies sich die Anzahl der phagozytierenden Leukozyten bei T4 und T6 vermindert. Die verbliebenen phagozytierenden Zellen zeigten allerdings keine Minderung in ihrer Intensität. Das bedeutet, dass sich zwar die Anzahl der phagozytierenden Leukozyten verringert hatte, die Phagozytoseaktivität der verbliebenen Zellen allerdings nicht beeinträchtigt war. Bei den neutrophilen Granulozyten zeigte sich lediglich am ersten Folgetag eine signifikante Minderung der Phagozytose-positiven Granulozyten. Auch das zeigt, dass zu T24 signifikant weniger Zellen Antigene phagozytierten als zu Beginn des Versuches, die verbliebenen Zellen allerdings in ihrer Phagozytoseaktivität nicht eingeschränkt waren. Bei den Monozyten zeigte sich die Intensität der einzelnen phagozytierenden Zellen zu T6 signifikant

vermindert (69). Zusammenfassend konnte auch bei der Phagozytose eine Einschränkung des Immunsystems durch den Alkoholkonsum gezeigt werden. Die Einschränkung der Phagozytose zeigte sich allerdings erst ab T4 (Leukozyten), hielt dafür aber bei den Granulozyten bis zum ersten Folgetag an. Diese Ergebnisse passen zu denen von Stadelbauer *et al.*, bei deren Versuchen ebenfalls gesunde Probanden 1‰ erreichen sollten. Sie zeigten drei Stunden nach dem einmaligen Konsum eines *Vodka*-Getränks und dem Erreichen von einer BAC von 1‰ einen Abfall der Phagozytose-positiven neutrophilen Granulozyten (74). Chiu *et al.* konnten sogar eine Korrelation zwischen der Alkoholkonzentration und der Abnahme der Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten zeigen. Dafür stimulierten sie in ihren Versuchen neutrophile Granulozyten, die sie aus dem Blut gesunder Probanden isoliert hatten, mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen und beobachteten die Phagozytose von *Klebsiella pneumoniae*. Hierbei stellten sie mit steigender Alkoholkonzentration eine Abnahme der Phagozytoseaktivität fest (106). Vrsalovic *et al.*, die ebenfalls Monozyten und neutrophile Granulozyten von gesunden Probanden isoliert hatten, konnten bei den von ihnen betrachteten Zellen zusätzlich eine verringerte Aufnahmefähigkeit von Antigenen sowie eine verringerte intrazellulärer Mikrobizidität bei gleichbleibender Phagozytoseaktivität zeigen (107). Ebenso wurde bereits von Roberts *et al.* ein unterdrückender Effekt bei der Digestion von DNA-Fragmenten in Monozyten und neutrophilen Granulozyten, die *ex vivo* mit Alkohol behandelt wurden, beschrieben (109). Diese Ergebnisse passen insofern zu denen von Haag *et al.*, als dass sie auch eine Einschränkung der Phagozytoseaktivität auf die Immunzellen gesunder Probanden nachweisen. Zusätzlich betrachteten die Studien von Roberts *et al.* und Vrsalovic *et al.* auch die Digestion der Antigene (107, 109). Dies stellt einen Aspekt dar, der in der vorliegenden Arbeit nicht abgedeckt werden konnte. Diese zeigt lediglich, dass die Aufnahme der Antigene in die phagozytierenden Zellen gestört ist, nicht aber, wie es sich mit der Fähigkeit der Zellen verhält, diese aufgenommenen Antigene auch abzubauen. Da dies jedoch einen essentiellen Teil der Phagozytose darstellt, sollten dahingehend weitere Untersuchungen angeknüpft werden. Des Weiteren gilt es zu klären, warum es zu einer reduzierten Phagozytoseaktivität kommt. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die bereits beschriebene Antigentoleranz dar, durch die es zu einer verminderten Aktivierung der Immunzellen durch eine verminderte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt.

Zusätzlich zu den Auswirkungen des Alkohols auf die Phagozytoseaktivität der Gesamtheit der Probanden konnten Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet werden. Die Monozyten der weiblichen Probanden zeigten bereits vor dem Alkoholkonsum eine signifikant höhere Intensität der Phagozytose (69). Eine von Aldebert *et al.* durchgeführte Studie betrachtete ebenfalls die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Phagozytoseaktivität. Dafür stimulierten sie das Blut gesunder Probanden mit Antigenen und führten eine FACS-Analyse durch. Hierbei zeigten sich keine quantitativen Unterschiede der phagozytierenden Monozyten zwischen weiblichen und männlichen Probanden, wobei die Intensität der Phagozytose nicht untersucht wurde (110). Diese Beobachtungen unterstützen den Trend der geschlechterspezifischen Betrachtung und sollten Anlass dafür bieten, auch in zukünftigen Studien die Geschlechter getrennt zu beobachten.

Neben der Produktion von ROS und der Phagozytose von Antigenen stellt auch die Invasion der Immunzellen in von Erregern befallene Zielorgane eine wichtige Kompetenz des Immunsystems dar (86).

7.8 Alkoholkonsum verringert die Adhäsion von humanen Monozyten an A549-Zellkulturen

Die Adhäsion spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Sie ermöglicht es den Immunzellen an Endothelzellen anzuhafeln und aus der Zirkulation zu migrieren. Diese Funktion ist essentiell dafür, dass die Zellen des Immunsystems in geschädigte Gewebe einwandern und dort eine Immunreaktion auslösen können (86). Janicova *et al.* konnten eine stetige Abnahme in der Anzahl der Monozyten, die an mit A549-Zellen bewachsenen Oberflächen adhärten, beschreiben. Diese Abnahme der Adhäsionsbereitschaft war zu den Zeitpunkten T4, T6 und T48 signifikant (70). Bei den oben genannten A549-Zellen handelt es sich um immortalisierte Zellen aus einer Linie eines Adenokarzinoms der menschlichen Lunge (111). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte verminderte Adhäsion indiziert, dass der Einfluss von Alkoholkonsum die Adhäsionsfähigkeit von Monozyten an Lungengewebe hemmt. Dass langfristiger Alkoholkonsum weiterhin einen hemmenden Einfluss auf die Migration von Monozyten ausübt, konnte von Imhof *et al.* gezeigt werden. Hierbei konsumierten gesunde Probanden über einen längeren Zeitraum Bier oder Wein. Dabei wurde die Anzahl der auf einer Kollagenmembran adhärierenden Monozyten bestimmt und war bei beiden Gruppen gemindert (112). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch den

Alkoholkonsum weniger Tumornekrosefaktor (TNF)- α ausgeschüttet wird (67, 113). TNF- α induziert die Bildung von Adhäsionsmolekülen und damit die Adhäsion der Monozyten an die Oberflächenepithelzellen (114). Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass unter dem Konsum von Alkohol weniger Monozyten in das körpereigene Gewebe einwandern können, um sich dort zu Makrophagen zu differenzieren. Kommt es vor diesem Hintergrund beispielsweise zu einem Trauma, hat dies einerseits den Effekt, dass weniger körpereigenes Gewebe geschädigt wird. Diese Wirkung konnten Relja *et al.* in Versuchen an Ratten mit dem hämorrhagischen Schock-Model zeigen, die im alkoholisierten Zustand eine geringere Schädigung der Leber aufwiesen (94). Ebenso konnten Xu *et al.* ähnliche Effekte bei alkoholisierten Mäusen mit einem Schädel-Hirn-Trauma aufzeigen, bei denen Leber und Lunge als traumaferne Regionen einen geringeren Schaden durch die systemische Reaktion auf das Trauma aufwiesen (115). Andererseits stellt die Adhäsion einen essentiellen Bestandteil der Immunantwort und Abwehr von Mikroorganismen dar. Wird diese geschwächt, führt dies folglich zu einer verminderten Immunkompetenz (86).

7.9 Abschluss und Ausblick

In Zusammenschau der dargelegten Erkenntnisse, konnte gezeigt werden, dass schon kleinere Mengen an Alkohol die Leistungsfähigkeit des angeborenen Immunsystems beeinflussen. Zusammenfassend bedeutet das, dass bereits einmaliger Alkoholkonsum die Zahl und Funktion der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten in der Zirkulation verringert. Die abfallende Anzahl dieser Zellen könnte durch die erhöhte Apoptoseaktivität bedingt sein. Die verringerte Funktion zeigt sich in einer niedrigeren ROS-Produktion, einer abgeschwächten Phagozytoseaktivität und einer verminderten Adhäsion. Diese Eigenschaften spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen. Verminderte Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion prädestinieren den betroffenen Organismus daher für Infektionen (86). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch den Konsum von Alkohol die Integrität der Darmbarriere geschwächt wird und potenzielle Erreger leichter in den Organismus eindringen können. Dies wird begleitet von einer entstehenden Toleranz gegenüber diesen Mikroorganismen und einem *Shift* der pro-inflammatorischen klassischen Monozyten hin zu den anti-inflammatorischen nicht-klassischen Monozyten. Dieser Einfluss des Alkohols dauert bis zu zwei Tage nach dem Zeitpunkt des Alkoholkonsums an. Zudem wurden signifikante Unterschiede in der Immunantwort zwischen den Geschlechtern

nachgewiesen. Die veränderte Immunantwort nach Alkoholkonsum hat das Potential, die Verläufe von verschiedenen Erkrankungen zu beeinflussen. So sollte sie u.a. bei der Behandlung eines polytraumatisierten Patienten berücksichtigt werden, da sie das klinische Ergebnis einer Behandlung beeinflussen könnte. Im nächsten Schritt könnten die in der Arbeit verwendeten Untersuchungen auf ein Modell im klinischen Alltag übertragen werden, das beispielsweise Traumapatienten einschließt, um so die klinische Relevanz der Auswirkungen von Alkoholkonsum auf das Immunsystem genauer darzustellen. Abschließend wäre es von klinischem Interesse, die Geschlechtsunterschiede in der Reaktion des Immunsystems auf den Konsum von Alkohol weiter zu untersuchen. Hierfür könnten weitere Parameter mit einer größeren Studienpopulation in einem ähnlichen Setting, im Sinne eines über einen definierten Zeitraum gesteigerten Alkoholkonsums untersucht werden.

7.10 Limitationen der Studie

Da die Studien, auf denen die vorliegende Arbeit basieren, an jungen und gesunden Probanden durchgeführt wurden, werden in erster Linie die Auswirkungen von Alkoholkonsum auf eben diese Kohorte beschrieben. Da ältere Individuen ein verändertes Immunsystem aufweisen (115), wäre folglich der Einschluss von älteren Probanden eine spannende und relevante Ergänzung der Studie. So könnten auch Aussagen über die Unterschiede der Immunkompetenz im Alter und die Auswirkung von Alkohol auf diese getroffen werden.

Ebenso beschreiben die vorliegenden Studien die Auswirkungen des kontinuierlichen Alkoholkonsums auf die Probanden. Die BAC von 1‰ wurde über einen Zeitraum von vier Stunden aufgebaut. Es kann somit nicht unterscheiden werden, ob es sich bei den einzelnen gezeigten Auswirkungen um Effekte der Einwirkzeit oder der gesteigerten Dosis handelt. Um die Wirkung der einzelnen Dosen isoliert betrachten zu können, müssten die Probanden jeweils nach einem Trinkintervall wieder ausnüchtern und über mehrere Tage abstinent bleiben. Anschließend würde eine weitere einmalige Alkoholgabe erfolgen, um die nächsthöhere BAC zu erreichen. So könnten die Auswirkungen der gesteigerten Dosis isoliert von der Einwirkzeit betrachtet werden. Hierfür könnten beispielsweise vier Ziel-BACs, wie 0,25‰, 0,5‰, 0,75‰ und 1‰, definiert werden. Am ersten Versuchstag wurden die Probanden eine berechnete Alkoholmenge trinken, um 0,25‰ zu erreichen. Die Blutentnahmen wären wieder zu den gleichen definierten Zeitpunkten und nach einer Woche Wartezeit würde der Versuchsaufbau erneut mit einer erhöhten Alkoholmenge (um 0,5‰ zu erreichen) beginnen. Dieser theoretische Versuchsaufbau bleibt allerdings durch ein hohes benötigtes Maß an Disziplin seitens der Probanden sowie einen erhöhten Arbeitsaufwand im Labor als eher schwer umsetzbar zu bewerten.

Eine weitere Limitation der Studie stellt der Phagozytose-Assay dar, mit dem lediglich die Aufnahme der Biopartikel in die entsprechenden Zellen aufgezeigt werden kann. Wie es sich mit vitalen Mikroorganismen verhält, könnte damit ebenso wenig bewertet werden, wie die Digestion der Antigene. So wäre es ein ergänzender Ansatz, die isolierten Immunzellen mit vitalen Bakterien zu inkubieren. Nach der Inkubationszeit würden die Immunzellen neutralisiert und die Bakterien wieder angezüchtet werden. Könnte auf diese Weise weniger oder kein Wachstum der

Bakterien gezeigt werden, würde dies für die Funktionalität der betrachteten Immunzellen sprechen.

Abschließend stellt die Darstellung der Beeinträchtigung der Darmbarriere mittels FABP-I einen weiteren limitierenden Faktor der Studie dar, da FABP-I lediglich als indirekter Nachweis für den Verlust der Darmbarriere angesehen werden kann. Eine Weiterführung des angewandten Versuchsaufbaus um einen Saccharid-Ausscheidungstests könnte hier eine sinnvolle Ergänzung bieten. In einem solchen Setting bekommen die Probanden schwer resorbierbare Zucker zu trinken, deren Konzentration im Urin im Anschluss bestimmt wird. Diese Zucker können vom Darm physiologisch nur in sehr geringen Mengen resorbiert werden. Ist die Integrität der Darmbarriere gestört, können die aufgenommenen Zucker diese leichter überwinden und werden folglich eher vom Organismus aufgenommen und ausgeschieden. Können diese Zucker daraufhin vermehrt im Urin nachweisen werden, ist dementsprechend von einer geschädigten Darmbarriere auszugehen.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Auswirkungen von Alkoholkonsum bei gesunden Probanden auf die Funktion von Leukozyten in ihrer Gesamtheit sowie Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Speziellen. Dafür tranken die Studienteilnehmer zwölf vorher berechnete Portionen eines *Whiskey-Cola* Mischgetränkes im Abstand von 20 Minuten, um über vier Stunden die Blutalkoholkonzentration von 1‰ zu erreichen. Dabei wurde den Probanden in zweistündigen Abständen (T0, T2, T4, T6) und an den beiden Folgetagen (T24, T48) Blut abgenommen. Ergänzend wurde über den ersten Versuchstag Urin asserviert. Im Detail wurden die Auswirkungen des Alkoholkonsums auf die Funktion der genannten Zellen beobachtet. Dabei wurden deren Anzahl, Fähigkeiten *Reactive Oxygen Species* (ROS) zu bilden, Antigene zu phagozytieren, an Zellkulturen zu adhären, sowie deren Apoptoseaktivität und die Verteilung der Monozyten-*Subsets* untersucht. Zusätzlich wurde die Integrität der Darmbarriere mithilfe von Biomarkern wie Syndecan1 und *Fatty Acid Binding Protein-1* (FABP-1) erfasst.

Es konnte dargestellt werden, dass der Konsum von Alkohol selbst bei gesunden Probanden sowohl eine Auswirkung auf die Zellzahl der betrachteten Immunzellen als auch auf deren Funktion hat. So konnte nach Beginn des Trinkens eine verminderte ROS-Produktion und eine verminderte Phagozytoseaktivität der Leukozyten und ihrer Untergruppen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden bei allen beobachteten Zellarten zu verschiedenen Zeitpunkten durch den Alkoholkonsum erhöhte Apoptoseraten aufgezeigt. Des Weiteren fand sich bei den Monozyten eine verminderte Adhäsion und eine Verschiebung der einzelnen Monozyten-*Subsets*. Ebenso konnte dargelegt werden, dass Alkoholkonsum die Integrität der Darmbarriere angreift und die Invasion von *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMPs) in die Zirkulation erleichtert.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass bereits ein moderater und singulärer Alkoholkonsum sogar noch vor dem Erreichen einer Blutalkoholkonzentration von 1‰ signifikante und vielseitig manifeste Auswirkungen auf das Immunsystem junger und gesunder Probanden ausübt.

9 Literatur

1. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Atzendorf J, Rauschert C, Seitz N-N, Lochbühler K, Kraus L. The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines: An Estimate of Consumption and Substance-Related Disorders in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116(35-36):577–84. doi: 10.3238/arztebl.2019.0577.
3. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res* 2015; 37(2):159–70.
4. Da BL, Im GY, Schiano TD. Coronavirus Disease 2019 Hangover: A Rising Tide of Alcohol Use Disorder and Alcohol-Associated Liver Disease. *Hepatology* 2020; 72(3):1102–8. doi: 10.1002/hep.31307.
5. Daly M, Robinson E. High-Risk Drinking in Midlife Before Versus During the COVID-19 Crisis: Longitudinal Evidence From the United Kingdom. *Am J Prev Med* 2021; 60(2):294–7. doi: 10.1016/j.amepre.2020.09.004.
6. Goeij MCM de, Suhrcke M, Toffolutti V, van de Mheen D, Schoenmakers TM, Kunst AE. How economic crises affect alcohol consumption and alcohol-related health problems: a realist systematic review. *Soc Sci Med* 2015; 131:131–46. doi: 10.1016/j.socscimed.2015.02.025.
7. Koopmann A, Georgiadou E, Kiefer F, Hillemacher T. Did the General Population in Germany Drink More Alcohol during the COVID-19 Pandemic Lockdown? *Alcohol* 2020; 55(6):698–9. doi: 10.1093/alcalc/aga058.
8. Rehm J, Shield KD. Global Burden of Alcohol Use Disorders and Alcohol Liver Disease. *Biomedicines* 2019; 7(4). doi: 10.3390/biomedicines7040099.
9. Larsson SC, Burgess S, Mason AM, Michaëlsson K. Alcohol Consumption and Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. *Circ Genom Precis Med* 2020; 13(3):e002814. doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002814.
10. Di Credico G, Polesel J, Dal Maso L, Pauli F, Torelli N, Luce D et al. Alcohol drinking and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration. *Br J Cancer* 2020; 123(9):1456–63. doi: 10.1038/s41416-020-01031-z.
11. Park S-Y, Wilkens LR, Setiawan VW, Monroe KR, Haiman CA, Le Marchand L. Alcohol Intake and Colorectal Cancer Risk in the Multiethnic Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2019; 188(1):67–76. doi: 10.1093/aje/kwy208.

12. Zaitso M, Takeuchi T, Kobayashi Y, Kawachi I. Light to moderate amount of lifetime alcohol consumption and risk of cancer in Japan. *Cancer* 2020; 126(5):1031–40. doi: 10.1002/cncr.32590.
13. Rehm J, Hasan OSM, Black SE, Shield KD, Schwarzing M. Alcohol use and dementia: a systematic scoping review. *Alzheimers Res Ther* 2019; 11(1):1. doi: 10.1186/s13195-018-0453-0.
14. Borges G, Cherpitel C, Mittleman M. Risk of injury after alcohol consumption: a case-crossover study in the emergency department. *Social Science & Medicine* 2004; 58(6):1191–200. doi: 10.1016/S0277-9536(03)00290-9.
15. Tulloh BR, Collopy BT. Positive correlation between blood alcohol level and ISS in road trauma. *Injury* 1994; 25(8):539–43.
16. Rathinam VAK, Chan FK-M. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends Mol Med* 2018; 24(3):304–18. doi: 10.1016/j.molmed.2018.01.004.
17. Klingensmith NJ, Fay KT, Lyons JD, Chen C-W, Otani S, Liang Z et al. Chronic Alcohol Ingestion Worsens Survival and Alters Gut Epithelial Apoptosis and CD8+ T Cell Function After *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia-Induced Sepsis. *Shock* 2019; 51(4):453–63. doi: 10.1097/SHK.0000000000001163.
18. Voigt RM, Forsyth CB, Shaikh M, Zhang L, Raeisi S, Aloman C et al. Diurnal variations in intestinal barrier integrity and liver pathology in mice: implications for alcohol binge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2018; 314(1):G131-G141. doi: 10.1152/ajpgi.00103.2017.
19. Pelsers MMAL, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT et al. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003; 36(7):529–35. doi: 10.1016/s0009-9120(03)00096-1.
20. Voth M, Duchene M, Auner B, Lustenberger T, Relja B, Marzi I. I-FABP is a Novel Marker for the Detection of Intestinal Injury in Severely Injured Trauma Patients. *World J Surg* 2017; 41(12):3120–7. doi: 10.1007/s00268-017-4124-2.
21. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Biochemical markers of acute intestinal ischemia: possibilities and limitations. *Ann Transl Med* 2018; 6(17):341. doi: 10.21037/atm.2018.07.22.
22. Salim SY, Young PY, Churchill TA, Khadaroo RG. Urine intestinal fatty acid-binding protein predicts acute mesenteric ischemia in patients. *J Surg Res* 2017; 209:258–65. doi: 10.1016/j.jss.2016.07.017.

23. Teng YH-F, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol* 2012; 31(1):3–16. doi: 10.1016/j.matbio.2011.10.001.
24. Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 2):2683–96. doi: 10.1083/jcb.103.6.2683.
25. Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li J-P, Esko JD, Yamaguchi Y et al. Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(1):229–38. doi: 10.1172/JCI32335.
26. Yablecovitch D, Oren A, Ben-Horin S, Fudim E, Eliakim R, Saker T et al. Soluble Syndecan-1: A Novel Biomarker of Small Bowel Mucosal Damage in Children with Celiac Disease. *Dig Dis Sci* 2017; 62(3):755–60. doi: 10.1007/s10620-016-4415-8.
27. Qing Q, Zhang S, Chen Y, Li R, Mao H, Chen Q. High glucose-induced intestinal epithelial barrier damage is aggravated by syndecan-1 destruction and heparanase overexpression. *J Cell Mol Med* 2015; 19(6):1366–74. doi: 10.1111/jcmm.12523.
28. Kavanagh K, Hsu F-C, Davis AT, Kritchevsky SB, Rejeski WJ, Kim S. Biomarkers of leaky gut are related to inflammation and reduced physical function in older adults with cardiometabolic disease and mobility limitations. *Geroscience* 2019; 41(6):923–33. doi: 10.1007/s11357-019-00112-z.
29. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992; 176(6):1665–71. doi: 10.1084/jem.176.6.1665.
30. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, Busse LA, Hu MC, Lichenstein HS et al. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Immunol* 1996; 156(11):4384–90.
31. Jacque B, Stephan K, Smirnova I, Kim B, Gilling D, Poltorak A. Mice expressing high levels of soluble CD14 retain LPS in the circulation and are resistant to LPS-induced lethality. *Eur J Immunol* 2006; 36(11):3007–16. doi: 10.1002/eji.200636038.
32. Flohé SB, Flohé S, Schade FU. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immun* 2008; 14(6):333–44. doi: 10.1177/1753425908100016.
33. Engelich G, Wright DG, Hartshorn KL. Acquired disorders of phagocyte function complicating medical and surgical illnesses. *Clin Infect Dis* 2001; 33(12):2040–8. doi: 10.1086/324502.

34. Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(2):220–32. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x.
35. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, Garcia ZC, Stein DS, Denny T et al. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med* 2003; 31(6):1722–9. doi: 10.1097/01.CCM.0000063579.43470.AA.
36. Kirchhoff C, Biberthaler P, Mutschler WE, Faist E, Jochum M, Zedler S. Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. *Crit Care* 2009; 13(3):R88. doi: 10.1186/cc7914.
37. Wutzler S, Maier M, Lehnert M, Henrich D, Walcher F, Maegele M et al. Suppression and recovery of LPS-stimulated monocyte activity after trauma is correlated with increasing injury severity: a prospective clinical study. *J Trauma* 2009; 66(5):1273–80. doi: 10.1097/TA.0b013e3181968054.
38. Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol* 2015; 49(1):57–64. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.10.002.
39. Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol* 2008; 42(4):237–47. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.02.003.
40. Pruetz BS, Pruetz SB. An explanation for the paradoxical induction and suppression of an acute phase response by ethanol. *Alcohol* 2006; 39(2):105–10. doi: 10.1016/j.alcohol.2006.08.003.
41. Neupane SP, Skulberg A, Skulberg KR, Aass HCD, Bramness JG. Cytokine Changes following Acute Ethanol Intoxication in Healthy Men: A Crossover Study. *Mediators Inflamm* 2016; 2016:3758590. doi: 10.1155/2016/3758590.
42. Bala S, Tang A, Catalano D, Petrusek J, Taha O, Kodys K et al. Induction of Bcl-3 by acute binge alcohol results in toll-like receptor 4/LPS tolerance. *J Leukoc Biol* 2012; 92(3):611–20. doi: 10.1189/jlb.0112050.
43. Franz N, Dieteren S, Köhler K, Mörs K, Sturm R, Marzi I et al. Alcohol Binge Reduces Systemic Leukocyte Activation and Pulmonary PMN Infiltration After Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock. *Inflammation* 2019; 42(2):690–701. doi: 10.1007/s10753-018-0927-z.

44. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 2014; 5:316. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316.
45. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 2020. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.
46. Singh A, Singh V, Tiwari RL, Chandra T, Kumar A, Dikshit M et al. The IRAK-ERK-p67phox-Nox-2 axis mediates TLR4, 2-induced ROS production for IL-1 β transcription and processing in monocytes. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(6):745–63. doi: 10.1038/cmi.2015.62.
47. Estruch M, Bancells C, Beloki L, Sanchez-Quesada JL, Ordóñez-Llanos J, Benitez S. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis* 2013; 229(2):356–62. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.011.
48. Relja B, Mörs K, Marzi I. Danger signals in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2018; 44(3):301–16. doi: 10.1007/s00068-018-0962-3.
49. Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology* 2009; 214(7):543–53. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.007.
50. Yan B, Han P, Pan L, Lu W, Xiong J, Zhang M et al. IL-1 β and reactive oxygen species differentially regulate neutrophil directional migration and Basal random motility in a zebrafish injury-induced inflammation model. *J Immunol* 2014; 192(12):5998–6008. doi: 10.4049/jimmunol.1301645.
51. Hörauf J-A, Kany S, Janicova A, Xu B, Vrdoljak T, Sturm R et al. Short Exposure to Ethanol Diminishes Caspase-1 and ASC Activation in Human HepG2 Cells In Vitro. *Int J Mol Sci* 2020; 21(9). doi: 10.3390/ijms21093196.
52. Mörs K, Hörauf J-A, Kany S, Wagner N, Sturm R, Woschek M et al. Ethanol Decreases Inflammatory Response in Human Lung Epithelial Cells by Inhibiting the Canonical NF- κ B-Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(1):17–30. doi: 10.1159/000480313.
53. Parlesak A, Diedrich JP, Schäfer C, Bode C. A low concentration of ethanol reduces the chemiluminescence of human granulocytes and monocytes but not the tumor necrosis factor alpha production by monocytes after endotoxin stimulation. *Infect Immun* 1998; 66(6):2809–13.
54. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327(5966):656–61. doi: 10.1126/science.1178331.

55. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 2019; 10:2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
56. Wypasek E, Padjas A, Szymańska M, Plens K, Siedlar M, Undas A. Non-classical and intermediate monocytes in patients following venous thromboembolism: Links with inflammation. *Adv Clin Exp Med* 2019; 28(1):51–8. doi: 10.17219/acem/76262.
57. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS ONE* 2010; 5(6):e11049. doi: 10.1371/journal.pone.0011049.
58. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(6):1306–16. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304650.
59. Köhl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006; 34(2):157–76. doi: 10.1385/IR:34:2:157.
60. Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. Pathophysiologie des Polytraumas : Intensivmedizin und "Timing" der Versorgung. *Chirurg* 2013; 84(9):753–8. doi: 10.1007/s00104-013-2477-0.
61. Relja B, Henrich D, Wetzel G, Sander AL, Jakob H, Maraslioglu M et al. Effects of acute ethanol gavage on intestinal integrity after hemorrhage/resuscitation. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48(4):448–58. doi: 10.3109/00365521.2013.772228.
62. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917):885–91. doi: 10.1038/nature01326.
63. Osuka A, Ogura H, Ueyama M, Shimazu T, Lederer JA. Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Med Surg* 2014; 1(2):63–9. doi: 10.1002/ams2.17.
64. Nau C, Wutzler S, Dörr H, Lehnert M, Lefering R, Laurer 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):661–6. doi: 10.1016/j.injury.2012.06.013.
65. Yaghoubian A, Kaji A, Putnam B, Virgilio N de, Virgilio C de. Elevated blood alcohol level may be protective of trauma patient mortality. *Am Surg* 2009; 75(10):950–3.

66. Salim A, Teixeira P, Ley EJ, DuBose J, Inaba K, Margulies DR. Serum ethanol levels: predictor of survival after severe traumatic brain injury. *J Trauma* 2009; 67(4):697–703. doi: 10.1097/TA.0b013e3181b5dcf2.
67. Relja B, Höhn C, Bormann F, Seyboth K, Henrich D, Marzi I et al. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *Br J Pharmacol* 2012; 165(4b):1188–99. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01595.x.
68. Sturm R, Haag F, Janicova A, Xu B, Vollrath JT, Bundkirchen K et al. Acute alcohol consumption increases systemic endotoxin bioactivity for days in healthy volunteers-with reduced intestinal barrier loss in female. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2021. doi: 10.1007/s00068-021-01666-4.
69. Haag F, Janicova A, Xu B, Powerski M, Facht M, Bundkirchen K et al. Reduced phagocytosis, ROS production and enhanced apoptosis of leukocytes upon alcohol drinking in healthy volunteers. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2021. doi: 10.1007/s00068-021-01643-x.
70. Janicova A, Haag F, Xu B, Garza AP, Dunay IR, Neunaber C et al. Acute Alcohol Intoxication Modulates Monocyte Subsets and Their Functions in a Time-Dependent Manner in Healthy Volunteers. *Front Immunol* 2021; 12:25. doi: 10.3389/fimmu.2021.652488.
71. Elm E von, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Prev Med* 2007; 45(4):247–51. doi: 10.1016/j.ypmed.2007.08.012.
72. Seidl S, Jensen U, Alt A. The calculation of blood ethanol concentrations in males and females. *Int J Legal Med* 2000; 114(1-2):71–7. doi: 10.1007/s004140000154.
73. Mörs K, Kany S, Hörauf J-A, Wagner N, Neunaber C, Perl M et al. Suppression of the interleukin-1 β -induced inflammatory response of human Chang liver cells by acute and subacute exposure to alcohol: an in vitro study. *Croat Med J* 2018; 59(2):46–50. doi: 10.3325/cmj.2018.59.46.
74. Stadlbauer V, Horvath A, Komarova I, Schmerboeck B, Feldbacher N, Wurm S et al. A single alcohol binge impacts on neutrophil function without changes in gut barrier function and gut microbiome composition in healthy volunteers. *PLoS ONE* 2019; 14(2):e0211703. doi: 10.1371/journal.pone.0211703.
75. Singhal PC, Reddy K, Ding G, Kapasi A, Franki N, Ranjan R et al. Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF-beta. *J Immunol* 1999; 162(5):3031–6.

76. Pruett SB, Fan R, Cheng B, Glover M, Tan W, Deng X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicol Sci* 2010; 117(2):314–24. doi: 10.1093/toxsci/kfq215.
77. Jimenez V, Moreno R, Kaufman E, Hornstra H, Settles E, Currie BJ et al. Effects of binge alcohol exposure on *Burkholderia thailandensis*-alveolar macrophage interaction. *Alcohol* 2017; 64:55–63. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.04.004.
78. Antón M, Rodríguez-González A, Ballesta A, González N, Del Pozo A, Fonseca FR de et al. Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide. *Br J Pharmacol* 2018; 175(24):4464–79. doi: 10.1111/bph.14501.
79. Oldenburger IB, Wolters VM, Kardol-Hoefnagel T, Houwen RHJ, Otten HG. Serum intestinal fatty acid-binding protein in the noninvasive diagnosis of celiac disease. *APMIS* 2018; 126(3):186–90. doi: 10.1111/apm.12800.
80. Edogawa S, Peters SA, Jenkins GD, Gurunathan SV, Sundt WJ, Johnson S et al. Sex differences in NSAID-induced perturbation of human intestinal barrier function and microbiota. *FASEB J* 2018:fj201800560R. doi: 10.1096/fj.201800560R.
81. Asai K, Buurman WA, Reutelingsperger CPM, Schutte B, Kaminishi M. Modular effects of estradiol on ethanol-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40(3):326–35. doi: 10.1080/00365520510011605.
82. Tang Y, Zhang L, Forsyth CB, Shaikh M, Song S, Keshavarzian A. The Role of miR-212 and iNOS in Alcohol-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2015; 39(9):1632–41. doi: 10.1111/acer.12813.
83. Huxley VH, Kemp SS. Sex-Specific Characteristics of the Microcirculation. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1065:307–28. doi: 10.1007/978-3-319-77932-4_20.
84. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 2017; 5(4):e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
85. Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS ONE* 2014; 9(5):e96864. doi: 10.1371/journal.pone.0096864.

86. Kany S, Janicova A, Relja B. Innate Immunity and Alcohol. *J Clin Med* 2019; 8(11). doi: 10.3390/jcm8111981.
87. Gacouin A, Roussel M, Le Priol J, Azzaoui I, Uhel F, Fest T et al. Acute alcohol exposure has an independent impact on C-reactive protein levels, neutrophil CD64 expression, and subsets of circulating white blood cells differentiated by flow cytometry in nontrauma patients. *Shock* 2014; 42(3):192–8. doi: 10.1097/SHK.000000000000195.
88. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016(11). doi: 10.1101/pdb.prot087312.
89. Ivanova SA, Vyalova NM, Zhernova EV, Bokhan NA. Spontaneous and in vitro induced apoptosis of lymphocytes and neutrophils in patients with alcohol dependence. *Bull Exp Biol Med* 2010; 149(2):246–9. doi: 10.1007/s10517-010-0918-z.
90. Hote PT, Sahoo R, Jani TS, Ghare SS, Chen T, Joshi-Barve S et al. Ethanol inhibits methionine adenosyltransferase II activity and S-adenosylmethionine biosynthesis and enhances caspase-3-dependent cell death in T lymphocytes: relevance to alcohol-induced immunosuppression. *J Nutr Biochem* 2008; 19(6):384–91. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.05.010.
91. Sato T, Takino J-I, Nagamine K, Nishio K, Hori T. RASGRP2 Suppresses Apoptosis via Inhibition of ROS Production in Vascular Endothelial Cells. *ScientificWorldJournal* 2019; 2019:4639165. doi: 10.1155/2019/4639165.
92. Yan F, Wang Y, Wu X, Peshavariya HM, Dusting GJ, Zhang M et al. Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death Dis* 2014; 5:e1010. doi: 10.1038/cddis.2013.551.
93. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998; 141(6):1423–32. doi: 10.1083/jcb.141.6.1423.
94. 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.
95. Greco M, Mazzei A, Palumbo C, Verri T, Lobreglio G. Flow Cytometric Analysis of Monocytes Polarization and Reprogramming From Inflammatory to Immunosuppressive Phase During Sepsis. *EJIFCC* 2019; 30(4):371–84.
96. Donnadieu-Rigole H, Mura T, Portales P, Duroux-Richard I, Bouthier M, Eliaou J-F et al. Effects of alcohol withdrawal on monocyte subset defects in

chronic alcohol users. *J Leukoc Biol* 2016; 100(5):1191–9. doi: 10.1189/jlb.5A0216-060RR.

97. Li X, Wang C, Nie J, Lv D, Wang T, Xu Y. Toll-like receptor 4 increases intestinal permeability through up-regulation of membrane PKC activity in alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2013; 47(6):459–65. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.05.004.

98. Liu Y, Tie L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- α -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway. *BMC Cardiovasc Disord* 2019; 19(1):279. doi: 10.1186/s12872-019-1263-4.

99. Muralidharan S, Lim A, Catalano D, Mandrekar P. Human Binge Alcohol Intake Inhibits TLR4-MyD88 and TLR4-TRIF Responses but Not the TLR3-TRIF Pathway: HspA1A and PP1 Play Selective Regulatory Roles. *J Immunol* 2018; 200(7):2291–303. doi: 10.4049/jimmunol.1600924.

100. Mitra S, Sarkar A. Microparticulate P2X7 and GSDM-D mediated regulation of functional IL-1 β release. *Purinergic Signal* 2019; 15(1):119–23. doi: 10.1007/s11302-018-9640-5.

101. Bakele M, Joos M, Burdi S, Allgaier N, Pöschel S, Fehrenbacher B et al. Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(8):5320–9. doi: 10.1074/jbc.M113.505636.

102. Provoost S, Maes T, Pauwels NS, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Lambrecht BN et al. NLRP3/caspase-1-independent IL-1 β production mediates diesel exhaust particle-induced pulmonary inflammation. *J Immunol* 2011; 187(6):3331–7. doi: 10.4049/jimmunol.1004062.

103. Hu C, Meng X, Huang C, Shen C, Li J. Frontline Science: ATF3 is responsible for the inhibition of TNF- α release and the impaired migration of acute ethanol-exposed monocytes and macrophages. *J Leukoc Biol* 2017; 101(3):633–42. doi: 10.1189/jlb.2HI1115-491R.

104. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* 2008; 154(1):87–97. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03737.x.

105. Gandhi JA, Ekhar VV, Asplund MB, Abdulkareem AF, Ahmadi M, Coelho C et al. Alcohol enhances *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia and systemic dissemination by impairing neutrophil antimicrobial activity in a murine model of infection. *PLoS ONE* 2014; 9(4):e95707. doi: 10.1371/journal.pone.0095707.

106. Chiu C-H, Wang Y-C, Yeh K-M, Lin J-C, Siu LK, Chang F-Y. Influence of ethanol concentration in the phagocytic function of neutrophils against *Klebsiella pneumoniae* isolates in an experimental model. *J Microbiol Immunol Infect* 2018; 51(1):64–9. doi: 10.1016/j.jmii.2016.03.004.
107. Vrsalovic M, Vrsalovic MM, Presecki AV, Lukac J. Modulating role of alcohol and acetaldehyde on neutrophil and monocyte functions in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50(4):462–5. doi: 10.1097/FJC.0b013e31812378fb.
108. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A et al. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. *Metab Clin Exp* 2004; 53(3):330–4. doi: 10.1016/j.metabol.2003.10.013.
109. Roberts PJ, Segal AW. The digestion of bacterial macromolecules by phagocytic cells: the effect of mepacrine and ethanol. *Immunology* 1987; 62(4):581–6.
110. Aldebert D, Hypolite M, Bal G, Dumestre-Pérard C, Bertini R-L, Rolland C et al. Effects of age, gender and time on receptor expression and anti-*Aspergillus* functions of human phagocytes. *Cell Immunol* 2011; 270(2):230–6. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.05.013.
111. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976; 17(1):62–70. doi: 10.1002/ijc.2910170110.
112. Imhof A, Blagieva R, Marx N, Koenig W. Drinking modulates monocyte migration in healthy subjects: a randomised intervention study of water, ethanol, red wine and beer with or without alcohol. *Diab Vasc Dis Res* 2008; 5(1):48–53. doi: 10.3132/dvdr.2008.009.
113. Zhao X-J, Marrero L, Song K, Oliver P, Chin SY, Simon H et al. Acute alcohol inhibits TNF-alpha processing in human monocytes by inhibiting TNF/TNF-alpha-converting enzyme interactions in the cell membrane. *J Immunol* 2003; 170(6):2923–31. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.2923.
114. Kim H, Hwang JS, Woo CH, Kim EY, Kim TH, Cho KJ et al. TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp Mol Med* 2008; 40(2):167–75. doi: 10.3858/emmm.2008.40.2.167.
115. Tang G, Yuan X, Luo Y, Lin Q, Chen Z, Xing X et al. Establishing immune scoring model based on combination of the number, function, and phenotype of lymphocytes. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(10):9328–43. doi: 10.18632/aging.103208.

10 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Besonders bei meinen Eltern Jutta und Bernhard Haag, die mir mein Studium ermöglicht haben, mich immer darin bestärkt haben meinen Weg zu gehen und mich nach Rückschlägen immer wieder aufbauen. Ebenso gilt ein ganz besonderer Dank meiner Partnerin Jasmin Bujok, die mich immer wieder unterstützt und mir dabei hilft die Herausforderungen in meinem Leben zu meistern.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. phil. nat. Borna Relja, die mich in ihr Team aufnahm, zu jeder Zeit unterstützte und stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Team der Experimentellen Radiologie der Universitätsklinik Magdeburg bedanken, insbesondere bei Andrea Janicova und Severin Gylstorff, die stets offen für meine Fragen waren und mich mit guten Ratschlägen unterstützten. Ebenso gilt mein Dank Dr. Ramona Sturm aus der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Probanden bedanken, die durch ihre Teilnahm diese Arbeit letztendlich ermöglicht haben.

11 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität
zur

Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Auswirkungen von Alkoholkonsum auf das angeborene Immunsystem gesunder
Probanden“

In der Universitätsklinik für Radiologie und Nuklearmedizin

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. phil. nat. Relja

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine
anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur
Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere
Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 26.05.2021

Unterschrift

12 Darstellung des Bildungsweges

Berufstätigkeit

- Seit 04/2021 Ärztlicher Mitarbeiter der Experimentellen Radiologie am
 Universitätsklinikum Magdeburg
- 12/2020 – 03/2021 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Experimentellen
 Radiologie am Universitätsklinikum Magdeburg

Schulbildung/ Studium

- 2016 - 2020: Studium der Humanmedizin an der Goethe-Universität
 Frankfurt

 Abschluss mit der Approbation 12/2020
- 2014 - 2016: Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
- 2011 - 2014: Käthe-Kollwitz-Schule Bruchsal (Biotechnologisches
 Gymnasium)

 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
- 2004 - 2011: Leopold-Feigenbutz Realschule, Oberderdingen

 Abschluss der Mittleren Reife

Forschungstätigkeiten

- Seit 12/2020: experimentelle Forschung in der Experimentellen
 Radiologie der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin,
 Universitätsklinikum Magdeburg, Direktor: Prof. Dr. med.
 Maciej Pech

 Projektleitung Prof. Dr. phil. nat. Relja
- 09/2019: Vortrag 23. Chirurgische Forschungstage in Aachen
- 05/2018 – 03/2021: experimentelle Forschung im Forschungslabor der Klinik für
 Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie,
 Universitätsklinikum Frankfurt, Direktor: Prof. Dr. med. Ingo
 Marzi

 Projektleitung Prof. Dr. phil. nat. Relja

Magdeburg, den 26.05.2021

13 Publikationen

13.1 Publikation 1:

Haag F., Janicova A., Xu B., Powerski M., Fachel M., Bundkirchen K., Neunaber C., Marzi I., Relja B., Sturm R.:

Reduced phagocytosis, ROS production and enhanced apoptosis of leukocytes upon alcohol drinking in healthy volunteers.

Eur J Trauma Emerg Surg. 2021 Mar 30. doi: 10.1007/s00068-021-01643-x. PMID: 33783566



Reduced phagocytosis, ROS production and enhanced apoptosis of leukocytes upon alcohol drinking in healthy volunteers

Florian Haag^{1,2} · Andrea Janicova¹ · Baolin Xu¹ · Maciej Powerski¹ · Melanie Fachel³ · Katrin Bundkirchen⁴ · Claudia Neunaber⁴ · Ingo Marzi² · Borna Relja^{1,2} · Ramona Sturm²

Received: 23 December 2020 / Accepted: 8 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Background Alcohol drinking is associated with a serious risk of developing health problems as well as with a large number of traumatic injuries. Although chronic alcohol misuse is known to contribute to severe inflammatory complications, the effects of an acute alcohol misuse are still unclear. Here, the impact of acute alcohol drinking on leukocyte counts and their cellular functions were studied.

Methods Twenty-two healthy volunteers (12 female, 10 male) received a predefined amount of a whiskey-cola mixed drink (40% v/v), at intervals of 20 min, over 4 h to achieve a blood alcohol concentration of 1‰. Blood samples were taken before drinking T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after starting drinking alcohol. Leukocytes, monocytes and granulocyte counts and their functions regarding the production of reactive oxidative species (ROS), phagocytosis and apoptosis were analyzed by flow cytometry.

Results Total leukocyte counts significantly increased at T_2 and T_4 , while granulocyte and monocyte counts decreased at T_4 and T_6 vs. T_0 . Monocytes increased significantly at T_{24} and T_{48} vs. T_0 . While the total number of ROS-producing leukocytes and notably granulocytes significantly increased, in parallel, the intracellular ROS intensity decreased at T_2 and T_6 . The numbers of ROS-positive monocytes have shown a delayed modulation of ROS, with a significant reduction in the total number of ROS-producing cells at T_{48} and a significantly reduced intracellular ROS-intensity at T_{24} . Phagocytosing capacity of leukocytes significantly decreased at T_4 and T_6 . In general leukocytes, and notably granulocytes demonstrated significantly increased early (T_2), while monocyte exerted significantly increased late apoptosis (T_{24} and T_{48}).

Conclusions Alcohol drinking immediately impacts leukocyte functions, while the impact on monocytes occurs at even later time points. Thus, even in young healthy subjects, alcohol drinking induces immunological changes that are associated with diminished functions of innate immune cells that persist for days.

Keywords Alcohol · Granulocytes · Monocytes · Phagocytosis · ROS · Apoptosis

Parts of this study have been presented as meeting abstracts.

✉ Borna Relja
Borna.Relja@med.ovgu.de

- 1 Experimental Radiology, Department of Radiology and Nuclear Medicine, Otto Von Guericke University, Magdeburg, Germany
- 2 Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Goethe University, Frankfurt, Germany
- 3 Chair of Medical Systems Technology, Institute for Medical Technology, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Otto Von Guericke University, Magdeburg, Germany
- 4 Trauma Department, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Abbreviations

BAC	Blood alcohol concentration
BSA	Bovine serum albumin
DAMP	Damage-associated molecular patterns
FACS	Fluorescence activated cell sorter
HV	Healthy volunteers
IL	Interleukin
ISS	Injury severity score
MFU	Mean fluorescence units
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered solution
ROS	Reactive oxygen species
T	Time point (hours)

Introduction

The consumption of alcohol is globally prevalent. In 2018, the World Health Organization's (WHO) "Global status report on alcohol and health" reported that 43% of the world's population over the age of 15 consumes alcohol [1]. In particular, the 2018 ESA study showed that 71.6% of Germans surveyed had consumed alcohol in the 30 days prior to the survey [2]. Alcohol consumption promotes the pathogenesis of numerous diseases and increases the risk of being involved in an accident and suffering a trauma [1]. In this context, blood alcohol concentration (BAC) correlates positively with injury severity [3]. The frequently observed changes in the course of diseases in alcohol-consuming individuals may be caused by the effects of alcohol on the immune system. Alcohol impacts both the function and the number of monocytes and neutrophils, which represent an important defense mechanism of the innate immune system against infections [4–6]. Decreased response of monocytes and neutrophils to inflammatory stimuli such as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and/or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) is associated with an increased incidence of complications such as sepsis and organ failure, as well as an increased mortality upon infection [7–9]. The effects of alcohol on the immune system show a biphasic characteristic and depends on the time of exposure as well as the dose [10–12]. Within 20 min after alcohol consumption, the number of circulating leukocytes increases, suggesting an early pro-inflammatory response, which is followed by an anti-inflammatory response with a systemic decrease in monocytes and natural killer cells. Also, systemic levels of pro-inflammatory interleukin (IL)-1 β , IL-6, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 decrease while anti-inflammatory IL-10 increases [10, 12, 13]. This later anti-inflammatory effect may cause the development of PAMPs tolerances [14]. This is underlined by reduced tissue invasion, as well as ROS-production and phagocytosis activity of the mentioned cells [5, 15–17]. Additionally, apoptosis mediated by caspases-3 and 7 is of crucial importance for balancing the immune system reactivity between immune suppression and regulation [18, 19]. It has been shown in vivo that neutrophils were less prone to apoptosis during thoracic trauma under the influence of alcohol [16].

These immune-suppressive effects on the immune system may also have an impact on alcoholized trauma patients. In a retrospective analysis of traumatized patients differences in outcomes between patients who were sober at the time of the accident, alcoholized patients, and patients with chronic alcohol abuse (alcoholic liver cirrhosis) were found [20]. In vivo studies also demonstrated that acute alcohol intoxication significantly reduced mortality

after hemorrhagic shock [21]. Although in vivo studies indicate that certain anti-inflammatory properties might cause even beneficial effects in conditions of acute inflammation, notably in the human scenario the knowledge is sparse. Thus, to improve the understanding of alcohol's impact on the immune system, we investigated the functional changes of leukocytes in terms of phagocytosis, ROS-formation and apoptosis upon acute alcohol drinking in healthy volunteers in a time and dose-dependent manner. Furthermore, gender-based differences have been assessed since here even less is known.

Patients and methods

Ethics

This study was performed in accordance with the institutional ethics committee approval from the University Hospital of the Goethe-University Frankfurt (No. 255/14), in accordance with the Declaration of Helsinki and following the Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology-guidelines [22]. All healthy volunteers (HV) signed the written informed consent form themselves in accordance with the ethical standards after detailed explanation of the investigations.

Study setting and population

Twelve female and ten male HV between 20 and 37 years of age were included. Exclusion criteria were a history of chronic alcohol consumption and pre-existing chronic inflammatory diseases, immunological disorders, HIV and hepatitis, immune-suppressive or anti-coagulant medication.

Study protocol

The trial day started each time in the early afternoon with a maximum of three HV per day. After eating a standardized meal, each HV got a 20 G venous cannula (Vasofix Braunüle, Braun, Melsungen Germany). The time when the HV started drinking was determined to be 4 pm. Each HV received over 4 h every 20 min a defined amount of alcohol according to the Widmark equation, including sex, age, high and weight of HV to reach a blood alcohol level of 1‰. The drinks consisted of Tennessee Whiskey Jack Daniels (40%) and cola (Coca-Cola) in a mixing ratio of 1:2. After the drinking period, a 2 h monitoring phase without further alcohol consumption followed. During the experiment, the maximum of additional drinks for the HV was limited by a liter of water. The test person were medically supervised and cared for the entire time. The same setting, population and protocol were used for additional studies which addressed

other aspects of the alcohol-caused modifications of the immune system.

Blood sampling

Blood was then taken from the venous cannula at defined time points, before drinking at T_0 , 2 (T_2), 4 (T_4) and 6 h (T_6) after starting the drinking period in heparin tubes (S-Monovette® lithium-heparin, Sarstedt, Nürmbrecht, Germany). Blood was also taken after 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) on the following days. To determine the BAC blood was taken every hour from T_0 to T_{48} in serum-gel tubes (Sarstedt).

Phagocytosis

To determine the phagocytosis activity of the monocytes and granulocytes, 100 μ L heparinized whole blood were incubated with FITC-labelled *E. coli* bacterial solution (*Escherichia coli*, K-12 strain, BioParticles™, Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. A negative control without *E. coli* was included. The cells were incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂ in darkness. Subsequently, 2 ml FACS buffer were added and samples were centrifuged at 300g for 5 min at room temperature followed by incubation in 0.5 ml of BD FACS Lysing Solution at room temperature and protected from light for 10 min. Then, 2 ml of FACS buffer (phosphate-buffered solution, PBS w/o Ca⁺/Mg⁺ plus 0.5% bovine serum albumin, BSA) were added and samples were centrifuged at 300g for 7 min at room temperature. This step was repeated one more time and cells were diluted in 100 μ L FACS buffer and stored on ice until measurement. The phagocytizing activity of granulocytes and monocytes was quantified as a percentage of absolute cell numbers measured using a commercial flow cytometric analysis by BD FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). From each sample, a minimum of 50,000 cells was measured, which were subsequently analyzed. Cells were gated according to their forward and side-scatter profiles.

Reactive oxygen species

The ROS detection reagent CM-H₂DCFDA from Invitrogen (USA) was used to determine the production of free oxygen species. 100 μ L heparinized whole blood were incubated with CM-H₂DCFDA reagent according to the manufacturer's instructions. A negative control without reagent was included. Cells were incubated for 30 min at 37 °C and 5% CO₂ in darkness. After washing with RPMI 1640 medium, another incubation period for one hour at 37 °C and 5% CO₂ followed. Then, 2 ml FACS buffer were added and samples were centrifuged at 300g for 5 min at room temperature followed by incubation in 0.5 ml of BD FACS Lysing Solution

at room temperature and protected from light for 10 min. Subsequently, 2 ml of FACS buffer were added and samples were centrifuged at 300g for 7 min at room temperature. This step was repeated one more time and cells were diluted in 100 μ L FACS buffer and stored on ice until measurement. Since CM-H₂DCFDA passively diffuses into the cells, the intracellular reactions with subsequent oxidation result in a fluorescent adduct, which enabled flow cytometric analysis using a BS FACS Canto II (BD Biosciences). Leukocytes, monocytes and granulocytes were gated according to their forward- and side-scatter profiles.

Apoptosis

To investigate apoptosis caspase-3 and 7 were determined. Caspase activity is found in all apoptotic processes and is thus associated with regulated cell death. 50 μ L of heparinized whole blood were incubated with the Fluorochrome Inhibitor of Caspases (FLICA) reagent FAM-DEVD-FMK, a target sequence between a green fluorescent label, carboxyfluorescein (FAM) and a fluoromethylketone (FMK) according to the manufacturer's instructions (FAM-FLICA® Caspase-3/7 Assay Kit, Immuno Chemistry, Bloomington, US). A negative control without FAM-FLICA reagent was included. Cells were incubated for 90 min at 37 °C and 5% CO₂ in darkness. Then, leukocytes were isolated by lysing red blood cells and the sample were washed with FACS buffer as described above. The reagent enters the cells and irreversibly binds to activated caspases-3 and 7. The green fluorescent signal is a direct measure of active caspase-3 and 7 enzyme activity and detectable with flow cytometric analysis using a BD FACS Canto II (BD Biosciences). Leukocytes, monocytes and granulocytes were gated according to their forward and side-scatter profiles.

Statistical analysis

GraphPad prism 6.0 software (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis. Data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). The Kruskal–Wallis test with a Dunn's post hoc test was applied to compare the differences between the groups. A *p* value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

Study population and blood alcohol concentration

Twenty-two healthy volunteers (HV) were enrolled in this study. The mean age was 25 \pm 4 years. 54.55% of the patients were female. The BAC increased significantly at T_2 and after 4 h at T_4 the aimed BAC of one per mille was reached. After

24 h as well as after 48 h no BAC was detectable. There were no significant gender-specific differences.

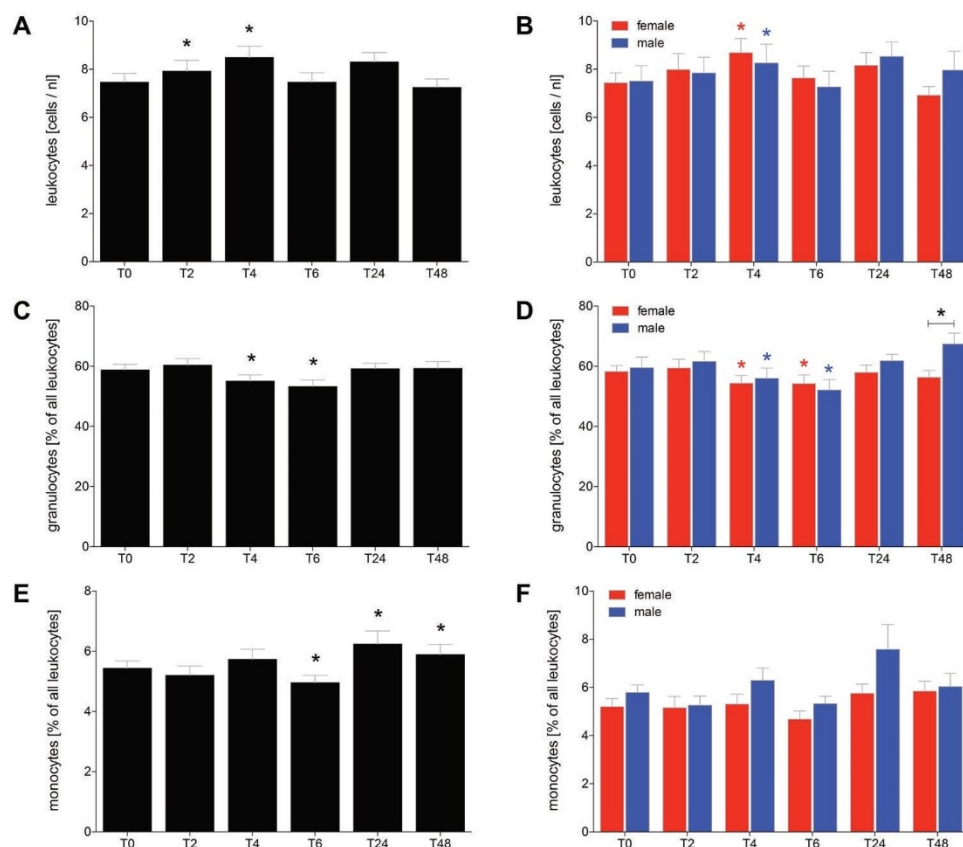
Alcohol-induced changes in circulating cell numbers of leukocytes

The total number of leukocytes significantly increased at T_2 and at T_4 compared with cell counts determined at T_0 before drinking ($p < 0.05$, Fig. 1a). Both female and male had a significant increase in the leukocytes counts at T_4 compared to cell numbers at T_0 before drinking ($p < 0.05$, Fig. 1b).

The proportion of granulocytes out of all leukocytes significantly decreased 4 h after starting of alcohol consumption at T_4 and T_6 compared T_0 , respectively ($p < 0.05$, Fig. 1c). This decrease was significant in both female and male HV ($p < 0.05$, Fig. 1d). However, at T_{48} there was a significant difference between female and male HV in the proportion of granulocyte, with significantly increased percentage in male ($p < 0.05$, Fig. 1d).

The proportion of monocytes out of all leukocytes significantly decreased at T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 1e). At T_{24} and T_{48} the proportion of monocytes out of all leukocytes significantly increased compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 1e). There were no significant changes between female and male (Fig. 1f).

Fig. 1 Total leukocyte counts after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking (a, b). The % of granulocytes (c, d) as well as monocytes (e, f) out of leukocytes. The analyses were performed in 12 female and 10 male volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after the start of alcohol consumption. The data are presented as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs T_0 or $p < 0.05$ vs. indicated groups



Alcohol-reduced production of reactive oxygen species in leukocytes

The ROS-producing capacity of leukocytes significantly decreased at T_2 and T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 2a). ROS-producing capacity in leukocytes was significantly decreased in male HV at T_2 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 2b).

Considering the ROS-producing capacity of granulocytes, there was a significant decrease at T_4 and T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 2c). The comparison between female vs. male HV has shown, that the ROS-producing capacity of granulocytes was significantly decreased at T_2 , T_4 , T_6 as well as T_{24} compared to T_0 in female ($p < 0.05$, Fig. 2d).

The ROS-producing capacity of monocytes was significantly decreased at T_{24} compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 2e). The comparison between female and male HV has shown no significant differences (Fig. 2f).

Alcohol-reduced phagocytosis in leukocytes

The proportion of phagocytizing leukocytes was significantly decreased at T_4 and T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 3a). This decrease was significant at T_4 in both female and male HV, while at T_6 the decrease was only significant in male compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 3b). During the complete

Fig. 2 The capacity of cells to produce reactive oxygen species (ROS) after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking in leukocytes (a, b), granulocytes (c, d) and monocytes (e, f). The analyses were performed in 12 female and 10 male healthy volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after the start of alcohol consumption. The data are presented as the mean of the mean fluorescence intensity (MFU) \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T_0

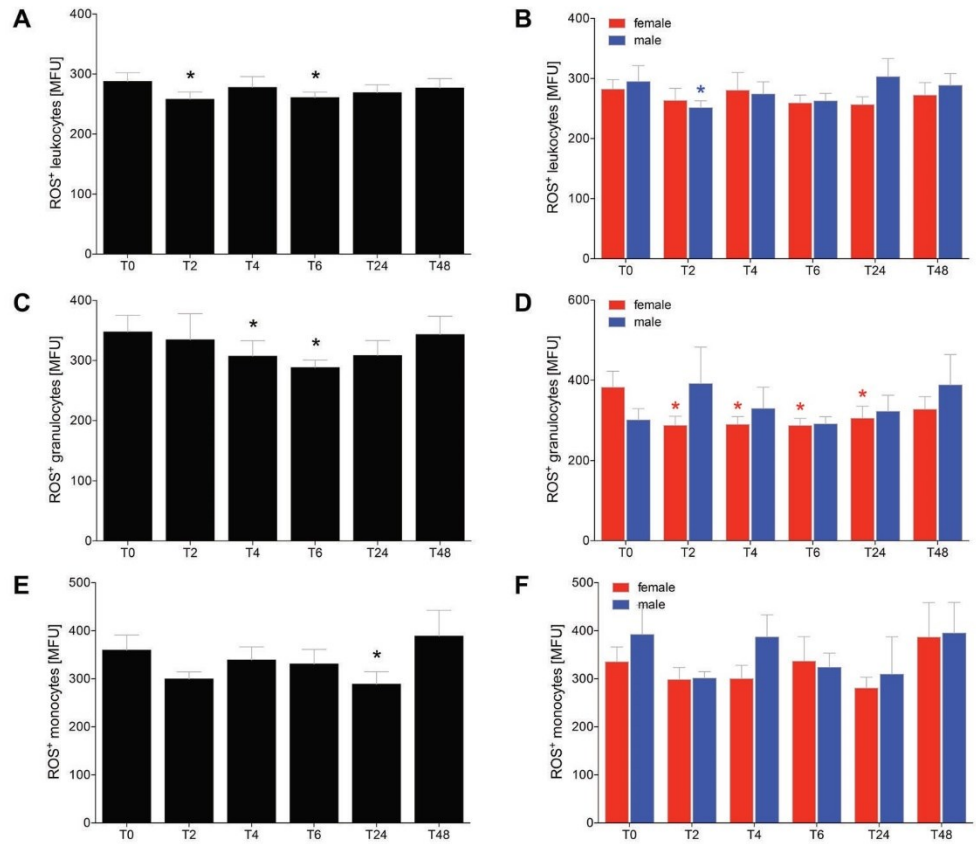
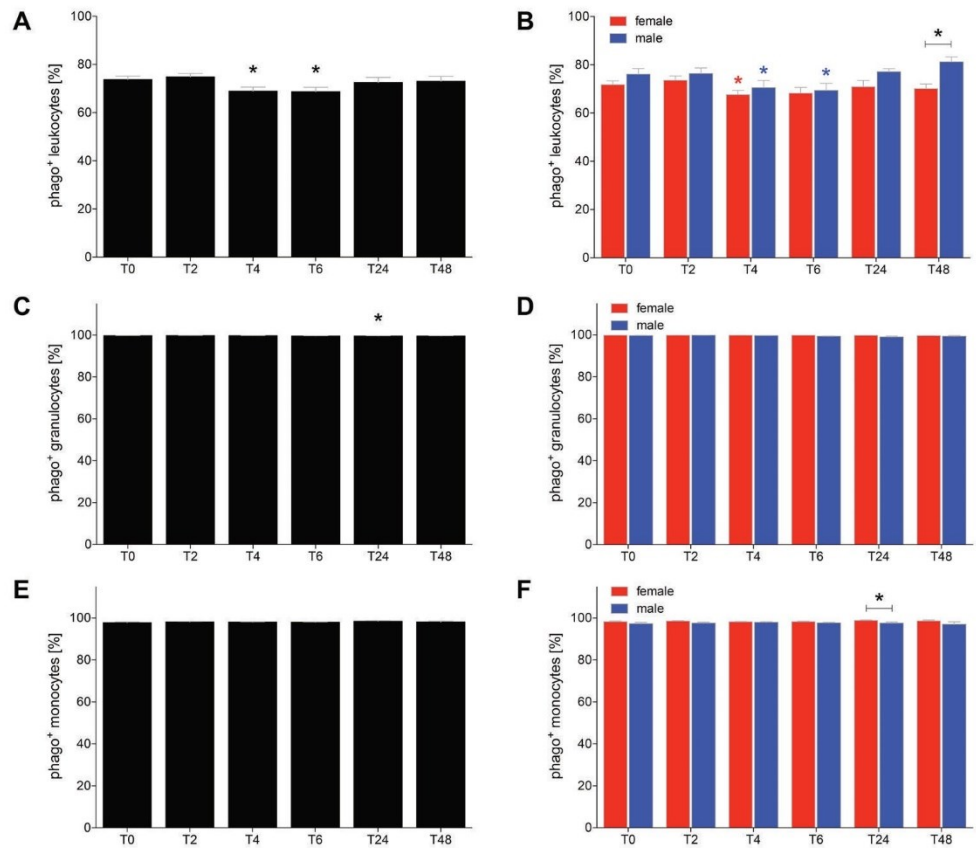


Fig. 3 The ratio of phagocytizing leukocytes (a, b), granulocytes (c, d) and monocytes (e, f) after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking. The analyses of cells positive for phagocytosis (phago⁺) were performed in 12 female and 10 male healthy volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after the start of alcohol consumption. The data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T_0 or $p < 0.05$ vs. indicated groups



observational period female HV had lower proportions of phagocytizing leukocytes compared to men, however, this difference was only significant at T_{48} (Fig. 3b).

The proportions of phagocytizing granulocytes remained stable with a slight increase at T_{24} , while there were no differences among monocytes (Fig. 3c–f).

The phagocytizing capacity was not significantly changed among leukocytes and granulocytes (Fig. 4a–d). In female HV the capacity of phagocytizing leukocytes was in general higher compared to male HV, while this difference was significant only at T_2 ($p < 0.05$, Fig. 4b, d).

The phagocytizing capacity of monocytes was significantly decreased at T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 4e). This decrease was only significant in female HV at T_6 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 4f). In general, female HV had higher phagocytizing capacity of monocytes compared to male HV at every time point. This gender difference was significant at T_0 before drinking, at T_2 and T_{48} ($p < 0.05$, Fig. 4f).

Alcohol-increased apoptosis in leukocytes

The proportion of caspase-3/7 positive leukocytes significantly increased at T_2 in all HV and in female HV compared to T_0 , respectively (Fig. 5a, b, $p < 0.05$). At the following time points, the proportion of caspase-3/7 positive

leukocytes decreased to a non-significant level compared to T_0 . The differences between the female and male HV had no significance after T_2 (Fig. 5b, $p < 0.05$).

The observed apoptosis of granulocytes behaved comparable to the apoptosis proportions as observed in total leukocytes. The proportion of caspase-3/7 positive granulocytes increased at T_2 significantly in all HV and in female HV at T_2 compared to T_0 , respectively (Fig. 5c, d, $p < 0.05$). At the following time points, the proportion of caspase-3/7 positive granulocytes decreased also to a non-significant level compared to the starting value at T_0 . The differences between the female and male HV was no further significantly changed (Fig. 5d, $p < 0.05$).

A similar distribution among the proportion of the caspase-3/7 positive monocytes as observed in total leukocytes and granulocytes at T_2 was observed (Fig. 5e, f).

The fluorescence intensity of caspase-3 significantly increased at T_2 in total leukocytes of HV and in female HV at T_2 compared to T_0 , respectively ($p < 0.05$, Fig. 6a, b). In the following observational period there were no further significant differences in the fluorescence intensity of caspase-3.

The fluorescence intensity in monocytes significantly increased at T_2 in HV as well as in both female and male at T_2 compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 6c, d, $p < 0.05$).

Fig. 4 The phagocytizing capacity of leukocytes (a, b), granulocytes (c, d) and monocytes (e, f) after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking. The analyses of mean fluorescence units (MFU) as the capacity measure for phagocytosis were performed in 12 female and 10 male healthy volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after the start of alcohol consumption. The data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T_0 or $p < 0.05$ vs indicated groups

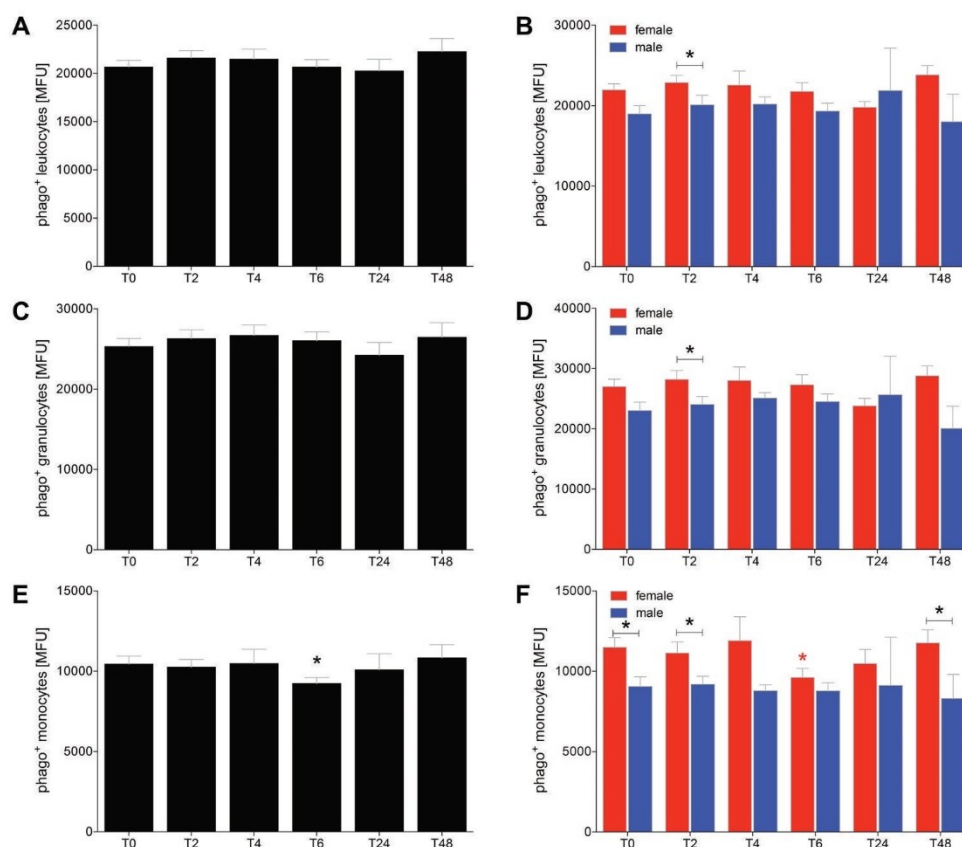


Fig. 5 The ratio of apoptotic leukocytes (**a, b**), granulocytes (**c, d**) and monocytes (**e, f**) after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking. The analyses of cells positive for caspase 3/7 (casp 3⁺) were performed in 12 female and 10 male healthy volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after start of alcohol consumption. The data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T_0 or $p < 0.05$ vs indicated groups

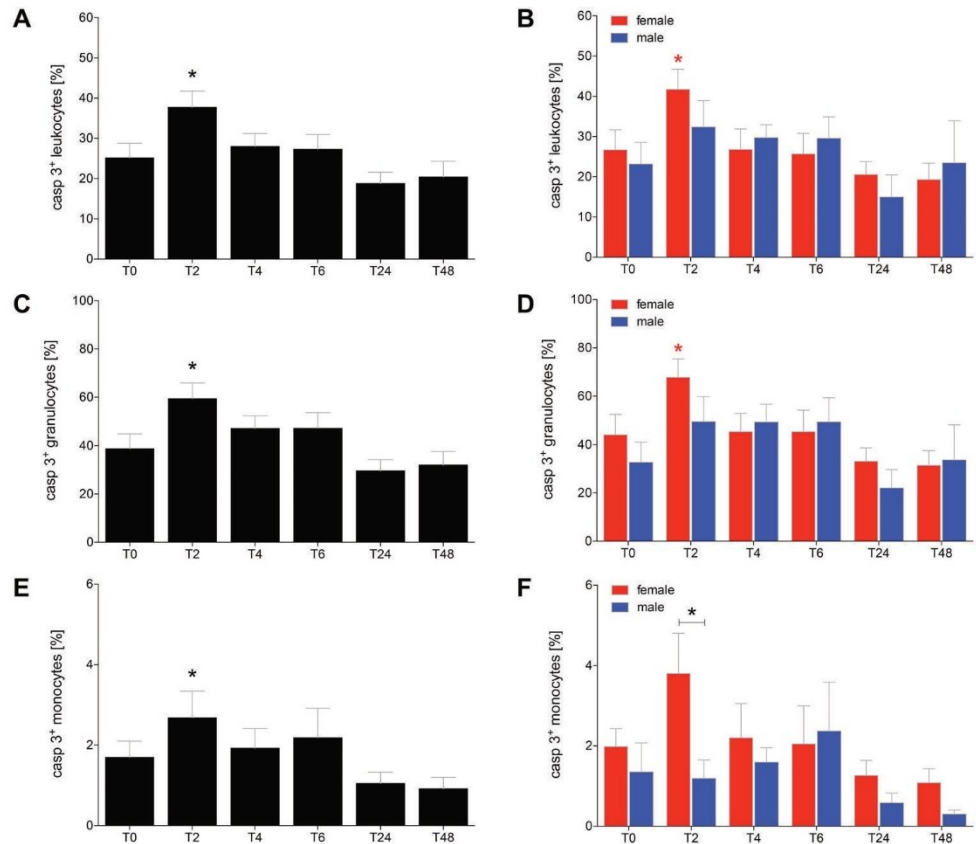
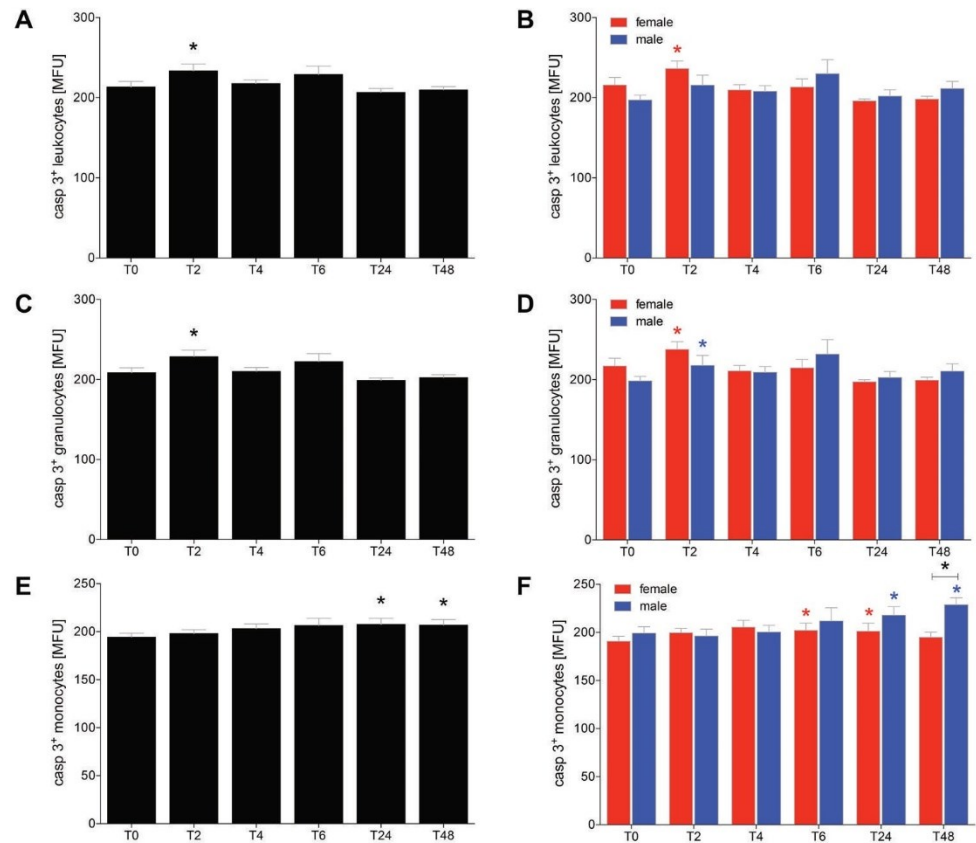


Fig. 6 The signal induction of apoptosis by quantitative determination of active caspase-3/7 in leukocytes (**a, b**), granulocytes (**c, d**) and monocytes (**e, f**) after acute alcohol drinking in healthy volunteers before, during and after drinking. The analyses of mean fluorescence units (MFU) as the capacity measure for apoptosis were performed in 12 female and 10 male healthy volunteers before T_0 , 2 h (T_2), 4 h (T_4), 6 h (T_6), 24 h (T_{24}) and 48 h (T_{48}) after the start of alcohol consumption. The data are presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T_0 or $p < 0.05$ vs indicated groups



With regard to caspase-3/7 positive monocytes, at T_{24} and T_{48} the increase in the intensity of caspase-3/7 expression was significant in total HV compared to T_0 ($p < 0.05$, Fig. 6e). In female HV, the expression intensity of active caspase-3/7 in monocytes was significantly increased at T_6 and T_{24} , while in male HV it was enhanced at T_{24} and T_{48} compared to T_0 , respectively ($p < 0.05$, Fig. 6f). At T_{48} the intensity significantly increased in male HV compared to female at T_{48} ($p < 0.05$, Fig. 6f).

Discussion

Previous studies have suggested that acute alcohol consumption may lead to the development of immunological tolerances against DAMPs and PAMPs, as shown e.g. by a reduced reaction of the immune system to antigens such as lipopolysaccharide [14, 15]. To further elaborate the impact of acute alcohol intoxication on the immunological background, we investigated the cellular functions including ROS production, phagocytosis and apoptosis of circulating leukocytes upon acute alcohol consumption in a time-dependent manner in healthy volunteers.

Our study has shown a significant increase in total leukocyte counts immediately in the first 4 h after drinking, while the cell counts recovered after 6 h to the baseline level. This initial stimulating effect of alcohol was also shown by Afshar et al. [10], that also has demonstrated the impact of binge drinking on the immune system of HV. Thus, the initial increase in leukocyte counts at two and four hours after drinking was paralleled by an early decrease in monocyte and granulocyte rates six hours later. In clinical trials, it was also shown that non-trauma patients with acute alcohol intoxication had a lower count of granulocytes [23]. This suggests that alcohol consumption affects the cell counts of both HV as well as patients. Further experiments are necessary to determine the differences and commons between those groups. However, the ratio of granulocytes and monocytes is apparently affected by alcohol, acute alcohol intoxication may trigger the production as well as the recruitment of leukocytes. These findings underline the reports of Afshar et al. showing initial inflammation upon alcohol binge drinking that was followed by anti-inflammatory effects [10]. Previous studies done by Parlesak et al. demonstrated a suppressive effect on the ROS-production in human granulocytes and monocytes which were isolated from the blood of HV [15]. On the other hand, enhancing effects of an acute alcohol intoxication on ROS production were demonstrated by Bailey et al., in rodent hepatocytes and Stadelbauer et al. in cells obtained from HV [24, 25]. However, chronic exposure to alcohol enhanced ROS production in monocytes [26, 27]. We could also confirm that acute alcohol intoxication reduced the ROS production of leukocytes, including both

monocytes and granulocytes. Interestingly, the ROS-reducing effects of alcohol were observed also after 24 h in monocytes, demonstrating prolonged suppressive influence of an acute intoxication with alcohol. The alterations regarding the ROS production during the observational timeline may be in line with findings reported by others demonstrating that the ROS production in human Chang liver cells depends on concentrations of alcohol to which the cells were exposed [28].

With regard to the phagocytizing capacity of leukocytes, acute intoxication of HV with alcohol had also diminishing effects on the phagocytic activity of leukocytes in the early phase of drinking. Interestingly, the percentage of phagocytizing leukocytes decreased at T_4 and T_6 without having any significant impact on the capacity of active cells to phagocytize. This may be explained by a potential compensated response by the remaining cells since the leukocyte counts increase immediately during drinking. A similar study design which also included HV showed also that acute alcohol drinking had only a minimal effect on phagocytizing activity of monocytes and granulocytes [25]. Another study, investigated specifically granulocytes which were isolated from HV demonstrated a decrease in the phagocytizing activity that is in line with the diminished amount of phagocytizing granulocytes in our study [29]. Moreover, a suppressive effect of high alcohol concentrations in the digestion of DNA fragments in monocytes which were isolated from HV is described [30]. Thus, taken together, these results are not contradictory to our findings, as we were also able to demonstrate an early decreasing effect of an acute alcohol intoxication on the phagocytizing behavior of leukocytes, albeit only to a reduced extent. Interestingly, the difference between female and male HV in terms of the phagocytizing capacity was even present before drinking alcohol. Notably female HV had a higher phagocytizing activity than male. Aldebert et al. have investigated the gender-specific differences in phagocytizing cells from HV. According to their study, there were no differences in the count of phagocytizing monocytes between female and male individuals [31]. However, the authors did not investigate the intensity in their study, and although we have observed some differences among the percentages of phagocytizing cells upon stimulation between female and male, the capacity of cells to phagocytosis has shown the most prominent effects. Thus, acute alcohol intoxication is associated with reduced capability of leukocytes to phagocytosis as well as to the production of ROS.

Interestingly, the % of apoptotic leukocytes including granulocytes as well monocytes enhanced immediately upon drinking, and this effect was caused by enhanced apoptosis in cells obtained from female HV. Such pro-apoptotic effects of inflammatory immune cells upon an acute exposure to alcohol were already shown before [32, 33] and underline the theory that alcohol exerts anti-inflammatory effects on immune cells [10]. However, here we could show that the

pro-apoptotic effect of alcohol is present immediately upon drinking. Furthermore, although the number of apoptotic monocytes apparently does not markedly change further after 24 or 48 h upon drinking, the activity of caspase-3/7 was enhanced in those cells that were positive for apoptosis. Already at the beginning of consumption, alcohol induced increased apoptosis in leukocytes, and thus weakened the immune system. This result may also be associated with later observed diminished proportions of granulocytes and monocytes as well as their reduced cellular functions, and provide explanation for the anti-inflammatory effects of acute alcohol intoxication. Although it was reported before that ROS also play an important role in programmed cell death [34, 35], the ROS production was rather reduced while apoptosis was induced. This discordance in observations may be due to the pro-apoptotic effects of alcohol [32] which may initially predominate.

Taken together, acute alcohol intoxication decreases the cellular functions of granulocytes and monocytes, which represent the most important players of the innate immune system in the defense against DAMPs, PAMPs and infections. This decrease may be caused by enhanced apoptosis rates of immune cells, potentially affecting subsequently also their functions with less efficient ROS production and phagocytizing activity. The weakening of phagocytosis and ROS-production can have a significant clinical impact. However, it could be shown before that a reduced phagocytizing activity in polymorphonuclear leukocytes correlated with a worse outcome of septic patients [36]. Thus, an alcohol-induced reduction of phagocytosis and ROS production may lead to an enhanced susceptibility to infections, that has already been demonstrated in several studies [29, 37]. It remains considerable that binge drinking influences the immune competence of the innate immune system immediately during drinking, and furthermore, that this influence of alcohol even exists up to 2 days after drinking. Interestingly, the significant differences in the immune response between female and male remain to be further elucidated in future studies.

Strengths

The extraordinary strength of this study is that it presents a very realistic model of binge drinking in HV. The subjects started at the evening with drinking and the consumption occurred over an extended period of time and BAC increased steadily. This setting is very common and represents a realistic way of getting drunk. It was also useful to determine alcohol-caused changes in the function of the observed parameters in a time- and dose-dependent manner and can easily be transferred to other populations e.g. in elder person, to determine the differences in the response to alcohol between young and elder populations. Furthermore,

our study also portrays the gender-based differences. This aspect has only been taken into account by a few studies so far but is nevertheless highly relevant.

Limitations

Within our wide experimental design, we did not have the capacity to study the functionality of the immune defense against vital microorganisms. For example, our phagocytosis-assay shows only how many cells are functionally phagocytizing but it cannot give a clue about the quality of the phagocytosis. It does not allow any statement about the digestion by the phagocytizing cells. To complete the state of knowledge here follow-up studies which investigate the ability of leukocytes to kill vital bacteria by phagocytosis and ROS formation should be performed.

Author contribution BR designed the study, obtained ethical approval, performed the statistical analysis and revised the manuscript. FH, RS, AJ and BX collected the samples and carried out all analysis. MP, MF, KB and CN contributed intellectually to the completion of the study and revised the manuscript. FH and RS wrote the manuscript. IM contributed intellectually to the completion of the study.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The study was supported by the Nachwuchsförderung AO Trauma Deutschland (R.S.).

Declarations

Conflict of interest The authors state that they have no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Atzendorf J, Rauschert C, Seitz N-N, Lochbühler K, Kraus L. The use of alcohol, tobacco, illegal drugs and medicines: an estimate of consumption and substance-related disorders in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116:577–84. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0577>.

3. Tulloh BR, Collopy BT. Positive correlation between blood alcohol level and ISS in road trauma. *Injury*. 1994;25:539–43.
4. Flohé SB, Flohé S, Schade FU. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immun*. 2008;14:333–44. <https://doi.org/10.1177/1753425908100016>.
5. Engelich G, Wright DG, Hartshorn KL. Acquired disorders of phagocyte function complicating medical and surgical illnesses. *Clin Infect Dis*. 2001;33:2040–8. <https://doi.org/10.1086/324502>.
6. Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33:220–32. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x>.
7. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, Garcia ZC, Stein DS, Denny T, Deitch EA. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med*. 2003;31:1722–9. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000063579.43470.AA>.
8. Kirchhoff C, Biberthaler P, Mutschler WE, Faist E, Jochum M, Zedler S. Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. *Crit Care*. 2009;13:R88. <https://doi.org/10.1186/cc7914>.
9. Wutzler S, Maier M, Lehnert M, Henrich D, Walcher F, Maegele M, et al. Suppression and recovery of LPS-stimulated monocyte activity after trauma is correlated with increasing injury severity: a prospective clinical study. *J Trauma*. 2009;66:1273–80. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181968054>.
10. Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol*. 2015;49:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.10.002>.
11. Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol*. 2008;42:237–47. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.02.003>.
12. Pruett BS, Pruett SB. An explanation for the paradoxical induction and suppression of an acute phase response by ethanol. *Alcohol*. 2006;39:105–10. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.08.003>.
13. Neupane SP, Skulberg A, Skulberg KR, Aass HCD, Bramness JG. Cytokine changes following acute ethanol intoxication in healthy men: a crossover study. *Mediat Inflamm*. 2016;2016:3758590. <https://doi.org/10.1155/2016/3758590>.
14. Bala S, Tang A, Catalano D, Petrusek J, Taha O, Kodys K, Szabo G. Induction of Bcl-3 by acute binge alcohol results in toll-like receptor 4/LPS tolerance. *J Leukoc Biol*. 2012;92:611–20. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112050>.
15. Parlesak A, Diedrich JP, Schäfer C, Bode C. A low concentration of ethanol reduces the chemiluminescence of human granulocytes and monocytes but not the tumor necrosis factor alpha production by monocytes after endotoxin stimulation. *Infect Immun*. 1998;66:2809–13.
16. Franz N, Dieteren S, Köhler K, Mörs K, Sturm R, Marzi I, et al. Alcohol binge reduces systemic leukocyte activation and pulmonary PMN infiltration after blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *Inflammation*. 2019;42:690–701. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0927-z>.
17. Relja B, Henrich D, Wetzler G, Sander AL, Jakob H, Maraslioglu M, et al. Effects of acute ethanol gavage on intestinal integrity after hemorrhage/resuscitation. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:448–58. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.772228>.
18. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24:1380–9. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
19. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456–62. <https://doi.org/10.1126/science.7878464>.
20. Nau C, Wutzler S, Dörr H, Lehnert M, Lefering R, Laurer H, et al. Liver cirrhosis but not alcohol abuse is associated with impaired outcome in trauma patients—a retrospective, multicentre study. *Injury*. 2013;44:661–6. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.06.013>.
21. Relja B, Höhn C, Bormann F, Seyboth K, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *Br J Pharmacol*. 2012;165:1188–99. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01595.x>.
22. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (strobe) statement: guidelines for reporting observational studies. *Prev Med*. 2007;45:247–51. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2007.08.012>.
23. Gacouin A, Roussel M, Le Priol J, Azzaoui I, Uhel F, Fest T, et al. Acute alcohol exposure has an independent impact on C-reactive protein levels, neutrophil CD64 expression, and subsets of circulating white blood cells differentiated by flow cytometry in nontrauma patients. *Shock*. 2014;42:192–8. <https://doi.org/10.1097/SHK.000000000000195>.
24. Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 1998;28:1318–26. <https://doi.org/10.1002/hep.510280521>.
25. Stadlbauer V, Horvath A, Komarova I, Schmerboeck B, Feldbacher N, Wurm S, et al. A single alcohol binge impacts on neutrophil function without changes in gut barrier function and gut microbiome composition in healthy volunteers. *PLoS ONE*. 2019;14:e0211703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211703>.
26. Kim MJ, Nagy LE, Park P-H. Globular adiponectin inhibits ethanol-induced reactive oxygen species production through modulation of NADPH oxidase in macrophages: involvement of liver kinase B1/AMP-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol*. 2014;86:284–96. <https://doi.org/10.1124/mol.114.093039>.
27. Hoyt LR, Randall MJ, Ather JL, DePuccio DP, Landry CC, Qian X, et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. *Redox Biol*. 2017;12:883–96. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.020>.
28. Mörs K, Kany S, Hörauf J-A, Wagner N, Neunaber C, Perl M, et al. Suppression of the interleukin-1 β -induced inflammatory response of human Chang liver cells by acute and subacute exposure to alcohol: an in vitro study. *Croat Med J*. 2018;59:46–50. <https://doi.org/10.3325/cmj.2018.59.46>.
29. Chiu C-H, Wang Y-C, Yeh K-M, Lin J-C, Siu LK, Chang F-Y. Influence of ethanol concentration in the phagocytic function of neutrophils against *Klebsiella pneumoniae* isolates in an experimental model. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018;51:64–9. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.03.004>.
30. Roberts PJ, Segal AW. The digestion of bacterial macromolecules by phagocytic cells: the effect of mepacrine and ethanol. *Immunology*. 1987;62:581–6.
31. Aldebert D, Hypolite M, Bal G, Dumestre-Pérard C, Bertini R-L, Rolland C, et al. Effects of age, gender and time on receptor expression and anti-*Aspergillus* functions of human phagocytes. *Cell Immunol*. 2011;270:230–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.013>.
32. Singhal PC, Reddy K, Ding G, Kapasi A, Franki N, Ranjan R, et al. Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF- β . *J Immunol*. 1999;162:3031–6.
33. Kapasi AA, Patel G, Goenka A, Nahar N, Modi N, Bhaskaran M, et al. Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Immunology*. 2003;108:313–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01584.x>.
34. Sato T, Takino J-I, Nagamine K, Nishio K, Hori T. RASGRP2 suppresses apoptosis via inhibition of ros production in vascular

- endothelial cells. *Sci World J.* 2019;2019:4639165. <https://doi.org/10.1155/2019/4639165>.
35. Yan F, Wang Y, Wu X, Peshavariya HM, Dusting GJ, Zhang M, Jiang F. Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1010. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.551>.
36. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. *Clin Exp Immunol.* 2008;154:87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03737.x>.
37. Gandhi JA, Ekhar VV, Asplund MB, Abdulkareem AF, Ahmadi M, Coelho C, Martinez LR. Alcohol enhances *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia and systemic dissemination by impairing neutrophil antimicrobial activity in a murine model of infection. *PLoS ONE.* 2014;9:e95707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095707>.

13.2 Publikation 2:

Janicova A., **Haag F.**, Xu B., Garza A.P., Dunay I.R., Neunaber C., Nowak A., Cavalli P., Marzi I., Sturm R., Relja B.:

Acute alcohol intoxication modulates monocyte subsets and their functions in a dose- and time-dependent manner in healthy volunteers.

Frontiers in Immunology. 2021 Mai 18. doi: 10.3389/fimmu.2021.652488



Acute Alcohol Intoxication Modulates Monocyte Subsets and Their Functions in a Time-Dependent Manner in Healthy Volunteers

Andrea Janicova¹, Florian Haag¹, Baolin Xu¹, Alejandra P. Garza², Ildiko Rita Dunay², Claudia Neunaber³, Aleksander J. Nowak¹, Paola Cavalli¹, Ingo Marzi⁴, Ramona Sturm^{4†} and Borna Relja^{1,4*†}

¹ Experimental Radiology, Department of Radiology and Nuclear Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany, ² Institute of Inflammation and Neurodegeneration, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Magdeburg, Germany, ³ Trauma Department, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁴ Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Goethe University, Frankfurt, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Haichao Wang,
Feinstein Institute for Medical
Research, United States

Reviewed by:

Jamal Hussien,
King Faisal University, Saudi Arabia
Vijay Arjun Ramchandani,
National Institute on Alcohol Abuse
and Alcoholism (NIAAA), United States

*Correspondence:

Borna Relja
borna.relja@med.ovgu.de

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 12 January 2021

Accepted: 26 April 2021

Published: 18 May 2021

Citation:

Janicova A, Haag F, Xu B, Garza AP,
Dunay IR, Neunaber C, Nowak AJ,
Cavalli P, Marzi I, Sturm R and Relja B
(2021) Acute Alcohol Intoxication
Modulates Monocyte Subsets and
Their Functions in a Time-Dependent
Manner in Healthy Volunteers.
Front. Immunol. 12:652488.
doi: 10.3389/fimmu.2021.652488

Background: Excessive alcohol intake is associated with adverse immune response-related effects, however, acute and chronic abuse differently modulate monocyte activation. In this study, we have evaluated the phenotypic and functional changes of monocytes in acutely intoxicated healthy volunteers (HV).

Methods: Twenty-two HV consumed individually adjusted amounts of alcoholic beverages until reaching a blood alcohol level of 1‰ after 4h (T4). Peripheral blood was withdrawn before and 2h (T2), 4h (T4), 6h (T6), 24h (T24), and 48h (T48) after starting the experiment and stained for CD14, CD16 and TLR4. CD14^{bright}CD16⁻, CD14^{bright}CD16⁺ and CD14^{dim}CD16⁺ monocyte subsets and their TLR4 expression were analyzed by flow cytometry. Inflammasome activation *via* caspase-1 in CD14⁺ monocytes was measured upon an *ex vivo in vitro* LPS stimulation. Systemic IL-1 β and adhesion capacity of isolated CD14⁺ monocytes upon LPS stimulation were evaluated.

Results: The percentage of CD14⁺ monocyte did not change following alcohol intoxication, whereas CD14^{bright}CD16⁻ monocyte subset significantly increased at T2 and T24, CD14^{bright}CD16⁺ at T2, T4 and T6 and CD14^{dim}CD16⁺ at T4 and T6. The relative fraction of TLR4 expressing CD14⁺ monocytes as well as the density of TLR4 surface presentation increased at T2 and decreased at T48 significantly. TLR4⁺CD14⁺ monocytes were significantly enhanced in all subsets at T2. TLR4 expression significantly decreased in CD14^{bright}CD16⁻ at T48, in CD14^{bright}CD16⁺ at T24 and T48, increased in CD14^{dim}CD16⁺ at T2. IL-1 β release upon LPS stimulation decreased at T48, correlating with TLR4 receptor expression. Alcohol downregulated inflammasome activation following *ex vivo in vitro* stimulation with LPS between T2 and T48 vs. T0. The adhesion capacity of CD14⁺ monocytes decreased from T2 with significance at T4, T6 and T48. Following LPS administration, a significant reduction of adhesion was observed at T4 and T6.

Conclusions: Alcohol intoxication immediately redistributes monocyte subsets toward the pro-inflammatory phenotype with their subsequent differentiation into the anti-inflammatory phenotype. This is paralleled by a significant functional depression, suggesting an alcohol-induced time-dependent hyporesponsiveness of monocytes to pathogenic triggers.

Keywords: ethanol, drinking, innate immunity, inflammasome, LPS, IL-1 β , CD14, TLR4

INTRODUCTION

Alcohol is one of the oldest and nowadays one of the most common addictive substances worldwide (1). Although low-to-moderate alcohol intake is associated with decreased risk of cardiovascular diseases and subsequent mortality (2), alcohol abuse contributes to the development of alcoholic liver disease, pancreatitis and further pathologies (1). In Germany, approximately 7.8 million adults drink excessive amounts of alcohol (3), causing 74,000 deaths every year (4). However, these numbers do not include physical trauma-related deaths that frequently occur under the influence of alcohol (4). Since up to 50% of physically traumatized patients are admitted to the emergency departments with an acute alcohol intoxication (5, 6), the numbers of alcohol-related deaths may be underestimated.

There is a rising evidence that alcohol intake has a biphasic effect on the innate immune response in a dose- and time-dependent manner (7–10). Chronic alcohol intake is associated with increased susceptibility to infections and sterile inflammation, which may cause severe tissue damage and poor outcomes after injury (1, 11). Following binge drinking, defined as an episodic excessive alcohol intake and the most common form of alcohol abuse, the counts of circulating leukocytes, monocytes and natural killer cells as well as the release of tumor necrosis factor (TNF)- α after an *ex vivo in vitro* whole blood stimulation with lipopolysaccharide (LPS) increase in the first 20 minutes after drinking, suggesting an early pro-inflammatory response. Subsequent decline of monocytes, natural killer cells and interleukin (IL)-1 β , IL-6 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 levels in circulation and the elevation of systemic IL-10 level suggest an anti-inflammatory state in the later course (7, 9, 12). In line with this data, leukocytes and IL-6 decrease in circulation was observed in severely injured patients with excessive alcohol intoxication (10). However, lower alcohol concentrations do not seem to induce the pro-inflammatory acute phase proteins (9). Those pro-inflammatory mediators are essential for the cell recruitment of the innate immune system and the initiation of the adaptive immune response (8), why acutely intoxicated patients with alcohol are potentially more vulnerable to infections.

Human monocytes exposed to moderate amount of alcohol *in vivo* or *in vitro* express significantly lower levels of pro-

inflammatory cytokines in Toll-like receptor (TLR)4-MyD88 and TLR-TRIF-dependent manner when stimulated with LPS *in vitro* (13). Additionally, activation of the nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) is downregulated p65/p50 dependently (14). The above described studies deal with monocytes as a single population, however, three monocyte subsets can be distinguished according to their expression levels of cluster of differentiation (CD)14 and CD16: Classical monocytes (CD14^{bright}CD16⁻) are released into circulation from bone marrow and act as a precursor for intermediate monocytes (CD14^{bright}CD16⁺), which in turn differentiate into non-classical monocytes (CD14^{dim}CD16⁺) (15). Classical subset has anti-microbial and innate immune sensing features, contributing to phagocytosis, adhesion and migration (15). Once they enter tissues, classical monocytes differentiate into monocyte-derived macrophages or dendritic cells, where they are crucial for shaping and subsequent resolution of inflammation (15). Intermediate monocytes regulate apoptosis and transendothelial migration (15), and their high occurrence in patients with systemic infections suggests a defensive role against invading pathogens (16). Non-classical monocytes provide complement- and FcR-mediated phagocytosis and are linked with anti-viral response to human immunodeficiency virus (15). In chronic excessive alcohol abuse, the numbers of classical monocytes are significantly reduced, whereas the non-classical monocytes display an increase in their counts, while the changes particularly restore two weeks following alcohol withdrawal (17). Although accumulating evidence indicates a shift in monocyte subsets under several pathological conditions, their distribution and function in acutely intoxicated subjects with alcohol remain elusive.

Considering that phenotypic and functional alterations of monocytes are substantially involved in the initiation and subsequent resolution of inflammation, we evaluated the phenotypic shift of monocytes following episodic excessive alcohol intake in healthy volunteers (HV). We hypothesized that acute alcohol intoxication shifts the monocytes toward the anti-inflammatory phenotype and ameliorates LPS-induced pro-inflammatory response *ex vivo in vitro* by suppressing the inflammasome activation.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The current study was performed pursuant to ethics committee approval (255/14) from the University Hospital of the Goethe-University Frankfurt and in accordance with the Declaration of

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; Bcl-3, B-cell lymphoma 3-encoded protein; CD, cluster of differentiation; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; HV, healthy volunteers; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MCP, monocyte chemoattractant protein; NLRP3, NLR family pyrin domain containing 3; NF- κ B, nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; PBS, phosphate-buffered saline; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

Helsinki and following the Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology-guidelines (18).

Patient Cohort

Twenty-two HV between 18 and 50 years of age were enrolled. Exclusion criteria included a history of chronic alcohol abuse, acute infection, pre-existing chronic inflammatory diseases, immunological disorders, human immunodeficiency virus infection, infectious hepatitis, medication and pregnancy. Renal insufficiency and changes in transaminases to identifying chronic liver diseases were excluded by blood test.

Study Design

Healthy volunteers received a standardized lunch (1 pizza) one hour before starting the experiment. Subsequently, HV consumed individually calculated amount of alcohol until reaching blood alcohol level of 1 ‰ after 4 hours. In detail, HV received whisky-coke cocktail (Tennessee Whiskey Jack Daniels, 40%; Coca-Cola) in a mixing ratio of 1:2 every 20 minutes for 4 hours. Then, the HV were monitored for further 2 hours without alcohol intake. For the individual calculation of the amount of alcohol to reach 1 ‰ after 4 hours, the modified Widmark equation including age, sex, height and weight was applied. Blood alcohol concentration (BAC) was monitored hourly until T6 and at T24 and T48. At every time point, a blood sample for the determination of the BAC was taken. Blood samples were obtained in prechilled ethylenediaminetetraacetic acid tubes (BD vacutainer; Becton Dickinson Diagnostics, Belgium) and kept on ice. Then, blood was centrifuged at $2,000 \times g$ and at 4°C for 15 minutes and the supernatant was immediately used for the determination of BAC using the diagnostic set serum EtOH by Cobas 8000 Modular Analyzer (Roche Diagnostic, Germany). The participants leaved the research facility after T6 and came back at T24 and T48. During the time out of the institute, participants were allowed to eat and drink with restriction of drinking alcohol. A brief overview of the study design and sampling is shown in **Figure 1**.

Blood Sampling

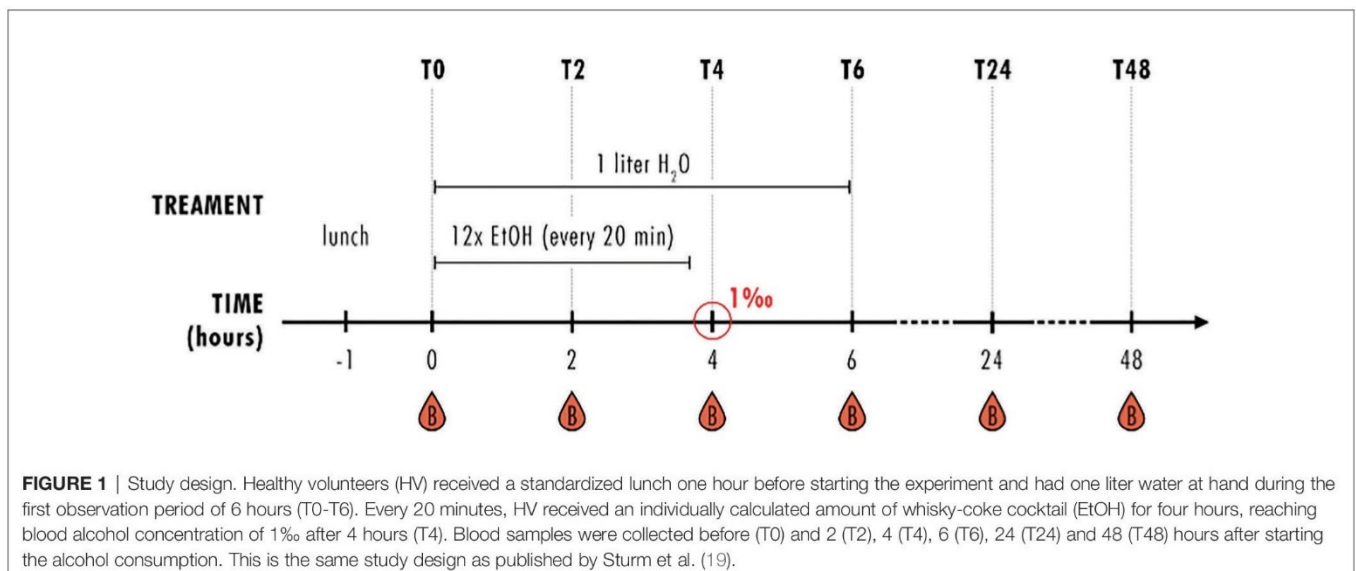
Peripheral blood was withdrawn in serum-gel and Li-Heparin collection tubes (Sarstedt, Germany) before (T0) and 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) and 48 (T48) hours after starting the alcohol consumption. Subsequently, the samples collected in serum-gel collection tubes were centrifuged directly after the collection at $2,000 \times g$ and at 4°C for 15 minutes. Serum was stored at -80°C until further analysis. Blood in Li-Heparin collection tubes were directly processed for flow cytometry and adhesion assay.

Analysis of Monocyte Subsets and TLR4 Expression by Flow Cytometry

100 μl heparinized blood was transferred into polystyrene FACS tubes (BD PharmingenTM). The samples were incubated with 5 μl CD14 (APC/Cy7; Clone M5E2; BioLegend), 5 μl CD16 (PE/Cy7; Clone 3G8; BioLegend) and 5 μl TLR4 (APC; Clone HTA125; BioLegend) in the dark at 4°C for 10 minutes. Subsequently, the samples were washed with 2 ml FACS buffer (0.5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS)) and centrifuged at $350 \times g$ at 4°C for 5 minutes. For red blood cells lysis, 3 ml lysis buffer (0.155 M NH_4Cl , 0.01 M KHCO_3 , 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) were added and incubated in the dark at 4°C . Washing step was repeated. Monocyte population was defined by gating the corresponding forward and side scatter scan. From each sample a minimum of 3.0×10^4 cells were measured, which were subsequently analyzed. The percentage of $\text{CD14}^{\text{bright}}\text{CD16}^-$ (classical subset), $\text{CD14}^{\text{bright}}\text{CD16}^+$ (intermediate subset) and $\text{CD14}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ (non-classical subset) as well the percentage and mean fluorescent units of TLR4 out of CD14^+ viable cells were assessed by flow cytometric analyses using a BD FACS Canto 2TM and FACS DIVATM software (BD Bioscience). Unspecific binding of the antibodies was excluded by using isotype controls.

Whole Blood Stimulation With LPS

50 μl heparinized blood was added to 450 μl RPMI 1640 media with supplements [100 UI/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 0.1 mg/ml



gentamycin, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)] and LPS at final concentration of 10 µg/ml (20). Subsequently, the samples were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours. After stimulation, the samples were centrifuged at 2,100 × g and at room temperature for 10 minutes. Supernatants were stored at -80°C until the further analysis.

Measurement of IL-1β

For the detection of IL-1β levels in directly collected serum (see Blood Sampling) and the supernatants after whole blood stimulation with LPS (see Whole Blood Stimulation With LPS), ELISA DuoSet kit (#DY201, R&D, USA) was used according to the provider's instructions.

Caspase-1 Activity

Active caspase-1 was quantified by using a FAM-FLICA Caspase-1 (YVAD) Assay Kit (ImmunoChemistry, USA) (21). 50 µl blood and 240 µl RPMI 1640 media with supplements was transferred into polystyrene FACS tubes. Samples were incubated with 1 µg/ml LPS (*E. coli* O127:B8 strain; Sigma Aldrich, Germany), 100 µM BzATP (ATP; Sigma-Aldrich, Germany) (22) and 10 µl 30X FAM-FLICA caspase-1 inhibitor) at 37°C and 5% CO₂ for 90 minutes. Subsequently, cells were washed with RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS 2 times. For red blood cell lysis, 3 ml lysis buffer (0.155 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.1 mM EDTA) were added and incubated in the dark at 4°C for 10 minutes. Cells were washed with 2 ml FACS buffer and centrifuged at 200 × g at 4°C for 5 minutes. Following pellet resuspension in 500 µl FACS buffer, caspase-1 expression was assessed by flow cytometric analyses using a BD FACS Canto 2™ and FACS DIVA™ software (BD).

Adhesion Assay

The isolation of CD14⁺ monocyte we described already elsewhere (23). Peripheral blood monocytes were isolated by a density-gradient centrifugation (Bicoll separation solution, 1.077 g/ml density; Biochrom, Germany). Here, 20 ml Bicoll separating solution was carefully overlaid with 20 ml of heparinized blood and centrifuged at 800 × g at room temperature for 30 minutes. Peripheral blood mononuclear cells from interphase were transferred into fresh tubes and washed with 10 ml FACS buffer and centrifuged at 350 × g at room temperature for 5 minutes. Remaining red blood cells were lysed by 10 ml lysis buffer in dark for 10 minutes and subsequently centrifuged. Following a further washing step with 15 ml MACS buffer (0.5% BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS w/o Mg²⁺ and Ca²⁺), cells were resuspended in 500 µl RPMI 1640 media with supplements. Mononuclear cells were stimulated with 1 µg/ml LPS at 37°C and 5% CO₂ for 90 minutes and subsequently washed with MACS buffer.

For CD14 labeling, cell pellet was resuspended in 75 µl MACS buffer and the cell suspension was incubated with 25 µl magnetic CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Germany) at room temperature for 15 minutes. Following a washing step with 3 ml MACS buffer, CD14⁺ labeled monocytes were magnetically isolated by using LS columns (Miltenyi Biotec, Germany)

according to the manufacturer's protocol. Following a further washing step with 10 ml FACS buffer, cell pellet was resuspended in 500 µl of RPMI 1640 media with supplements. Only cell cultures with a purity and viability of ≥95% were used for further experiments. Cell population purity was evaluated by flow cytometry according its size and CD14 expression. Cell viability was proved by Türk's solution exclusion assay (Merck, Darmstadt, Germany).

The adhesion assay was performed as described before (24). 200,000 CD14⁺ monocytes were seeded in 6-well flat-bottom plate (Sarstedt, Germany), where adherent A549 pulmonary epithelial cells to the density of 80% were seeded a day before, and, incubated at 37°C and 5% CO₂ for 35 minutes. Cells were washed twice with RPMI 1640 media with supplements and following fixation by 1 ml 1% glutaraldehyde for 3 minutes, monocytes were washed once more with PBS. Adherent monocytes on plates were stored in 2 ml PBS in the dark and at 4°C until evaluation. The adherent monocytes were then counted in 5 different fields of a defined size (5×0.25 mm²) using a phase contrast microscope (×20 objective). The mean cellular adhesion rate was calculated.

Statistics

GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis. Data are given as mean ± standard error of the mean (SEM). The data distribution was tested by the D'Agostino-Pearson test, and the data is not normally distributed. Since we have 6 groups with matched or repeated measures, thus paired data, the non-parametric Friedman's test was applied. Dunn-Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons was used. T0 is the base condition to which the others were compared. The Wilcoxon matched-pairs signed rank test as a nonparametric statistical tool comparing two paired groups in **Figure 6** was used to determine if two sets of pairs are different from one another in a statistically significant manner. Spearman's correlation coefficient was calculated to determine correlations. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the Study Participants

From 22 healthy volunteers, 12 female and ten male with a mean age of 25 (± 4) years were enrolled. All included individuals exerted normal ranges of transaminases excluding chronic e.g. liver diseases, since the ranges at T0 were: 15-20 U/l GGT, 22 U/l GPT and 23 U/l GOT. Thus, no individuals with chronic liver diseases or malfunction were included. Furthermore, the BAC increased to 0.46±0.02‰ at T2, with further at T4 (1.11±0.05‰) reaching the target BAC of 1‰. At T6 BAC decreased to 0.83±0.06‰ and was not further detectable at T24 and T48.

Acute Alcohol Intake Modulates the Distribution the CD14⁺ Monocyte Subsets

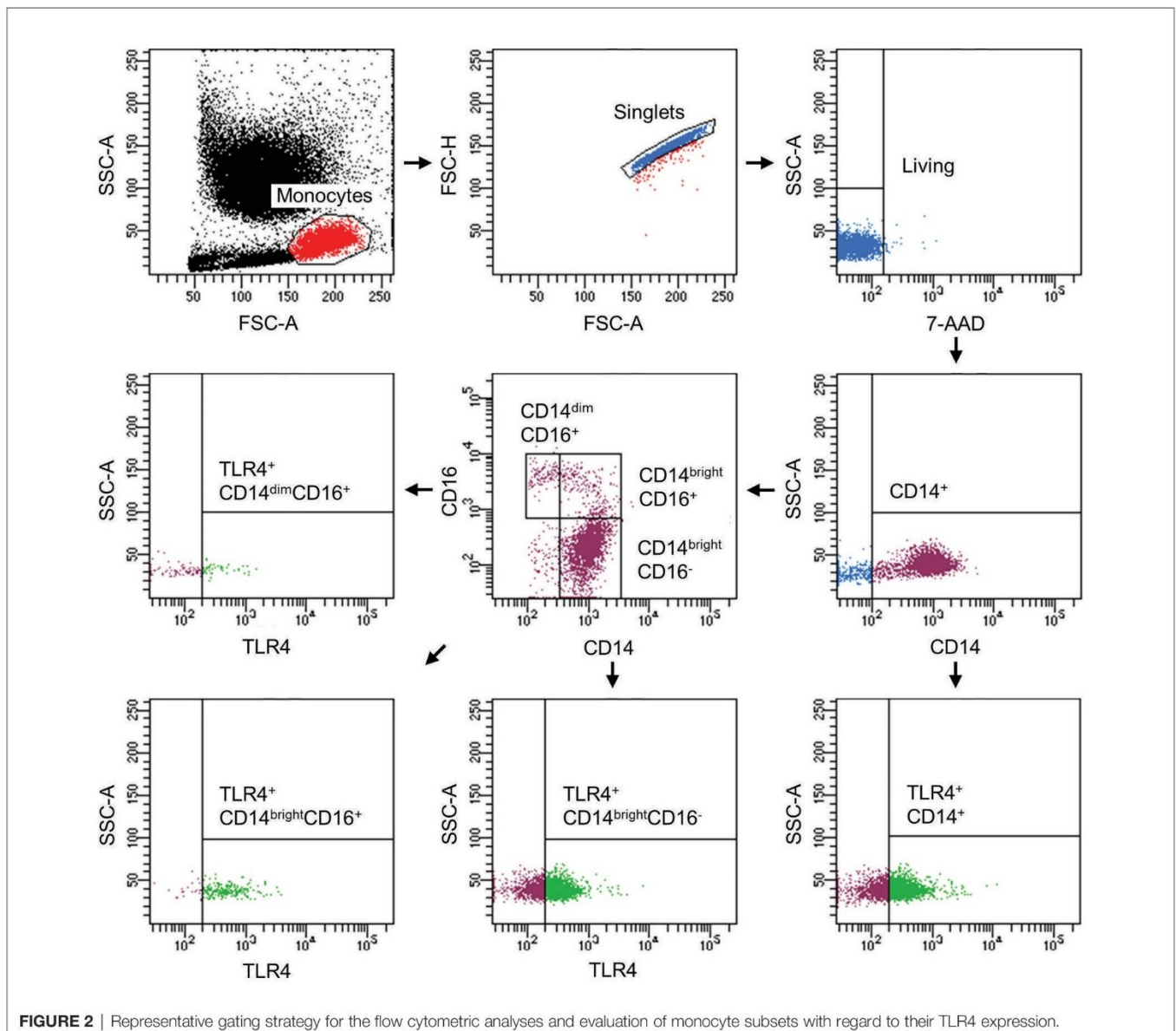
Since it is known that alcohol misuse has modulating effects on the immune system, we investigated the distribution of different

monocytes subsets in healthy volunteers following excessive acute alcohol intake. Fluorescently *ex vivo in vitro* labeled circulating monocytes were gated as it is shown in the **Figure 2**. Following alcohol intake, the percentage of CD14⁺ monocytes did not change during the whole observational period of 48 hours compared to the counts before the experiment start (T0) (**Figure 3A**). Regarding the subsets, the classical monocytes defined as CD14^{bright}CD16⁻ cells became significantly more abundant at T2 and T24 after starting drinking alcohol compared to T0 (**Figure 3B**, $p < 0.05$). The intermediate CD14^{bright}CD16⁺ monocytes displayed a significant increase in the first 6 hours (T2, T4, T6) with subsequent decrease to the baseline at T24 and T48 (**Figure 3C**, $p < 0.05$). We observed an increase of non-classical CD14^{dim}CD16⁺ subset at T4 and T6 hours compared to the counts at T0, followed by decrease from T24 (**Figure 3D**, $p < 0.05$).

Combining the absolute cell numbers of leukocytes per microliter (25) with the relative fractions of monocytes and their subsets, we converted the percentages of monocyte subsets into absolute cell numbers. These are summarized in **Supplementary Table 1**.

TLR4 Expression Is Upregulated in the Early Phase and Downregulated in the Later Phase of Acute Alcohol Intake

Following the determination of monocyte subsets, we analyzed the expression of surface receptor TLR4. The representative gating strategy of TLR4-positive monocytes is shown in the **Figure 2**. The abundance of TLR4⁺ CD14⁺ monocytes significantly increased at T2 while decreasing to base level at T6 until T24 (**Figure 4A**, $p < 0.05$). At T48, TLR4 expression was significantly decreased compared to



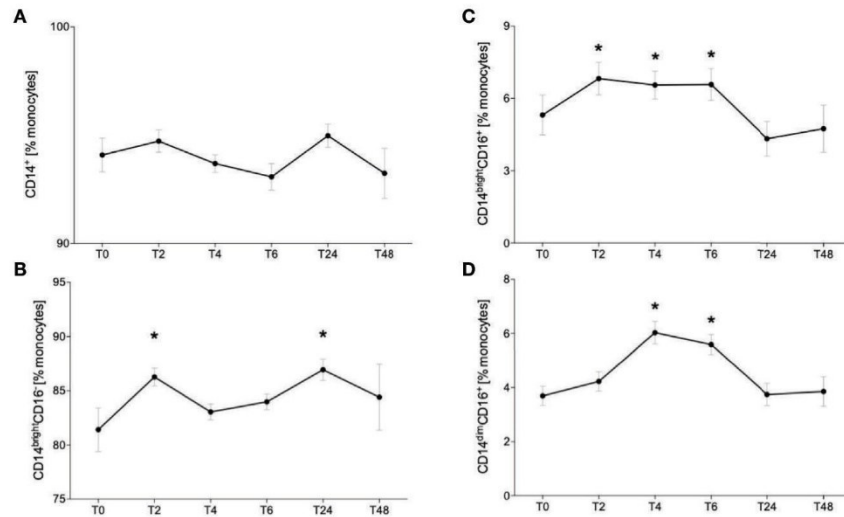


FIGURE 3 | Impact of acute alcohol intoxication on monocyte subset distribution. Percentage distribution of CD14⁺ (A) classical (CD14^{bright}CD16⁻) (B), intermediate (CD14^{bright}CD16⁺) (C) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) (D) was determined in blood of healthy volunteers (n=22) before (T0) and 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) and 48 (T48) hours after starting the alcohol consumption. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. *p < 0.05 vs. T0.

T0 (Figure 4A, $p < 0.05$). The relative fraction of TLR4⁺ CD14^{bright}CD16⁻ classical monocytes increased significantly at T2 and T6 vs. T0 (Figure 4B, $p < 0.05$). CD14^{bright}CD16⁺ intermediate and CD14^{dim}CD16⁺ non-classical subsets showed a significant elevation of TLR4⁺ monocytes at T2 compared to T0 (Figures 4C, D, $p < 0.05$).

Additionally, to the relative fraction of TLR4⁺ monocytes, we evaluated the mean TLR4 expression on monocytes. CD14⁺ monocytes displayed significantly higher expression at T2 and significantly reduced TLR4 receptor density at T48 compared to T0 (Figure 4E, $p < 0.05$). Rising trend was indicated at T2 and T6 in classical monocyte subset and the density of TLR4 decreased significantly at T24 vs. T0 (Figure 4F, $p < 0.05$). Intermediate monocytes showed increased TLR4 expression at T2 and a significant decline at T24 and T48 compared to T0 (Figure 4G, $p < 0.05$). The non-classical subset displayed significant elevation of TLR4 receptor intensity at T2 vs. T0 (Figure 4H, $p < 0.05$).

IL-1 β Release Following Ex Vivo In Vitro Whole Blood Stimulation With LPS Is Diminished Two Days After Acute Alcohol Intake Correlating With TLR4 Receptor Density on Monocytes

Further, since it is known that ethanol inhibits the NLRP3 inflammasome activation, we evaluated the levels of circulating IL-1 β and following *ex vivo in vitro* stimulation with LPS. IL-1 β was not detectable in serum directly obtained from the participants at all time points (detection limit of 3.91 pg/mL; data not shown). Following LPS stimulation, we have shown that the acute ethanol intoxication did not have an impact on IL-1 β concentration at T2, T4 and T6 compared to IL-1 β concentration before starting binge drinking (T0) (Figure 5A). At T24, we observed a slight decrease that continued and became significant at T48 vs. T0

(Figure 5A, $p < 0.05$). This IL-1 β level positively correlated with TLR4 receptor density on monocytes at T48 (Figure 5B).

Ethanol Intake Leads to Hyporesponsiveness to Secondary Hit

A brief overview about *ex vivo in vitro* experimental design and representative gating strategy is shown in Figures 6A, B. Level of active caspase-1 did not show significant changes in CD14⁺ monocytes during the entire observation period of 48 hours compared to the level before alcohol intoxication (T0) (Figure 6C). The *ex vivo in vitro* stimulation of CD14⁺ monocytes with 1 μ g/mL LPS and 100 μ M ATP led to significant increase of caspase-1 expression at all time points compared to equivalent unstimulated monocytes (Figure 6C, $p < 0.05$). At T2, T6 and T48, caspase-1 expression significantly decreased following LPS and ATP stimulation compared to stimulated monocytes at T0 (Figure 6C, $p < 0.05$).

Furthermore, we found that the adhesion capacity of CD14⁺ monocytes is impaired by alcohol intake. *Ex vivo in vitro*, CD14⁺ monocytes displayed less adhesion to A549 cells from T2 until T48 compared to T0, with significance at T4, T6 and T48 (Figure 6D, $p < 0.05$). Following LPS administration, monocyte adhesion decreased from T6 until T48 vs. stimulated monocytes at T0, with significances at T4 and T6 (Figure 6D, $p < 0.05$). At T48, significant increase in adhesion rates of LPS stimulated monocytes compared to unstimulated monocytes is shown (Figure 6D, $p < 0.05$). At T6, there is no difference in adhesion rates between stimulated and unstimulated monocytes (Figure 6D).

DISCUSSION

Excessive alcohol drinking is associated with adverse immune response-related effects such as susceptibility to nosocomial

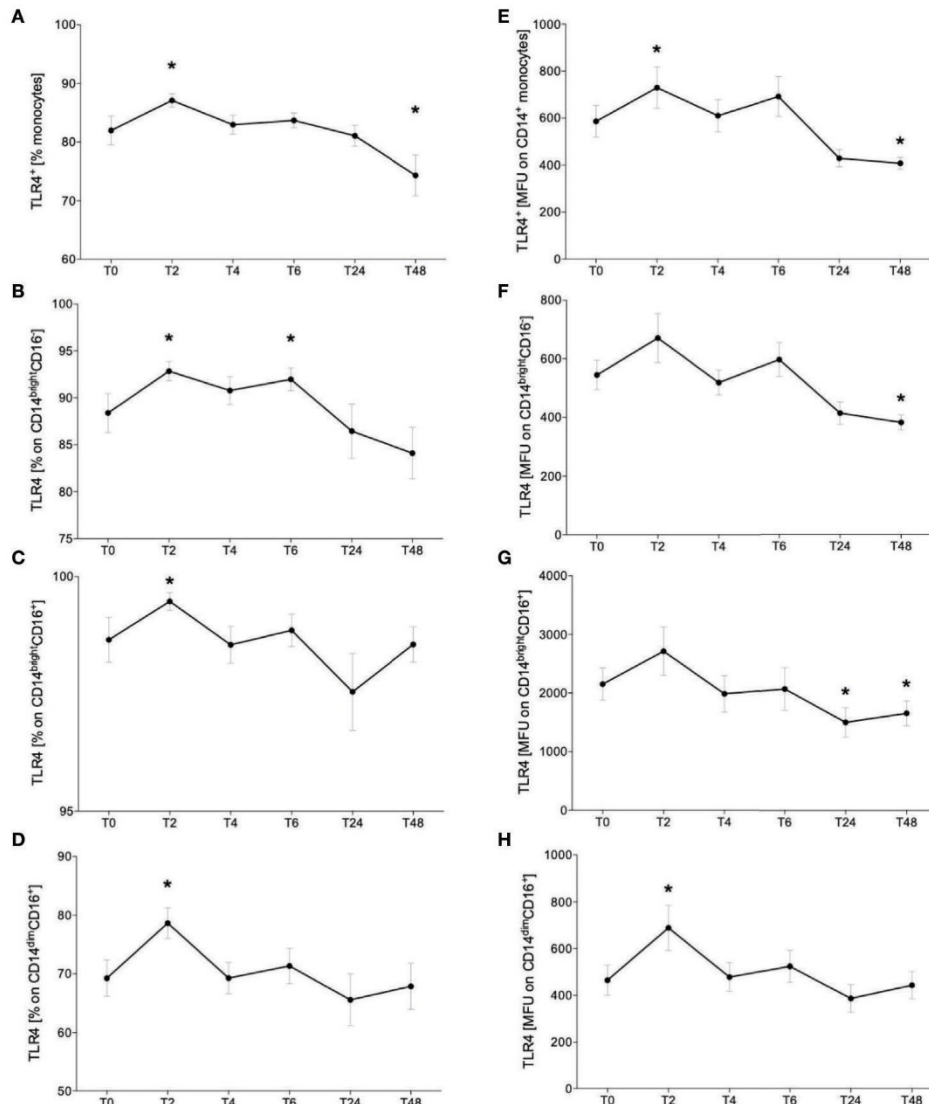
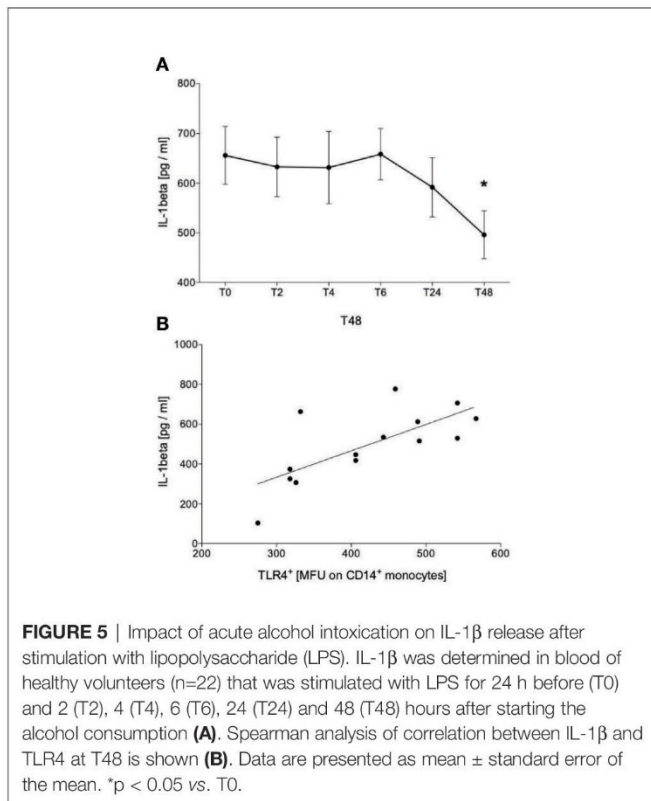


FIGURE 4 | Impact of acute alcohol intoxication on Toll-like receptor 4 (TLR4) surface presentation on monocytes. Percentage and mean intensity expression of TLR4 on CD14⁺ monocytes (A, E) and the classical (CD14^{bright}CD16⁻) (B, F), intermediate (CD14^{bright}CD16⁺) (C, G) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) (D, H) monocyte subsets were determined in blood of healthy volunteers (n=22) before (T0) and 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 24 (T24) and 48 (T48) hours after starting the alcohol consumption. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. *p < 0.05 vs. T0.

infections with possible further progression to acute respiratory distress syndrome or sepsis (26). Following traumatic injury, monocytes show a shift toward the pro-inflammatory phenotype (23), and whereas chronic alcohol intake causes an exaggerated differentiation into the anti-inflammatory phenotype (17), the effect of acute alcohol intake still remains elusive. Since there is a frequent coincidence of alcohol misuse and traumatic injuries (5, 6), understanding of their interaction and the mechanisms of ongoing misbalanced immune response after trauma may contribute to the development of advanced therapeutic strategies for alcohol-intoxicated severely injured patients. Therefore, we evaluated the phenotypic and functional changes

of monocytes in intoxicated HV. The key results are summarized in **Figure 7**.

In this study, HV consumed calculated amount of whiskey-coke cocktail every 20 minutes during the first 4 hours of the experiment, reaching a blood alcohol level of 1%. Over the whole observation period of 48 hours, the relative fraction of CD14⁺ monocytes remained stable, whereas the individual monocyte subsets showed significant alterations. Classical monocytes, characterized by CD14^{bright}CD16⁻ expression, provide phagocytosis contributing to immune defense against invading pathogens and are equated with murine pro-inflammatory Ly6C^{bright} monocytes (15, 27). Two hours after

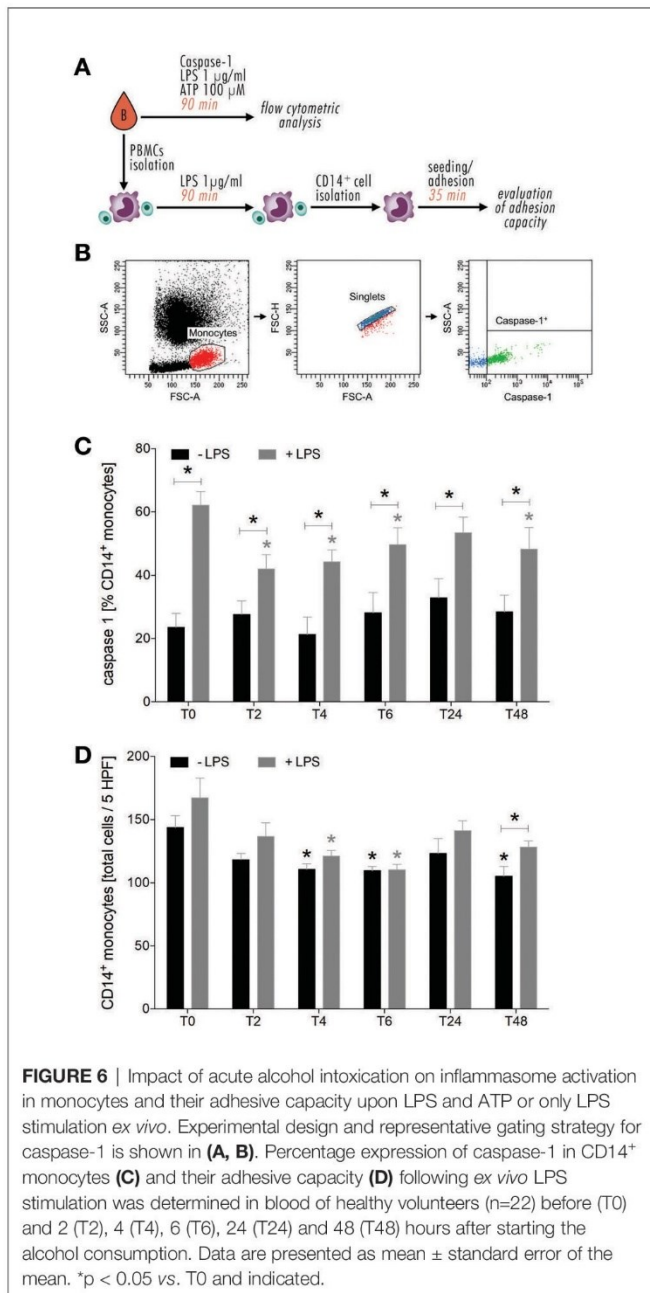


drinking, the ratio of classical subset significantly increased. This was paralleled by increased abundance of intermediate subset that lasted for 6 hours and by enhanced levels of non-classical monocytes between 4 and 6 hours after alcohol intake. It is generally accepted that classical monocytes are precursors for the intermediate subset, which expresses the highest levels of antigen presentation-related molecules and has been linked with rapid immune defense in systemic infections (15, 16). Alcohol intoxication has been shown to enhance the expression of MCP-1 and C-C chemokine receptor type 2 in pancreas and microglia, contributing to the extent of tissue injury (28, 29). Therefore, binge alcohol drinking may cause a release of classical monocytes from the bone marrow within the first 2 hours after drinking, which in turn may differentiate into intermediate monocytes. Regarding the delayed increase of the relative non-classical monocyte fraction, it seems, that alcohol intoxication converts the intermediate into non-classical monocytes and thereby, switch their pro-inflammatory character into an immunosuppressive cell type. Under the same experimental settings, it has been shown that absolute leukocyte numbers significantly increase two and four hours after starting alcohol drinking, suggesting an early mobilization of immune system (25). The percentage of granulocytes out of all leukocytes decreases significantly at four and six hours, whereas the monocyte percentage decreases first significantly at six hours with subsequent significant elevation at 24 and 48 hours post-drinking (25). The current literature describes changes in leukocyte subpopulations almost exclusively in chronic alcohol abuse, although these changes are not less relevant in acute

setting of alcohol drinking. Gacouin et al. analyzed leukocytes in critically ill patients, which have been acutely intoxicated with alcohol (30). They have shown that the circulating neutrophils and classical monocytes are less present in those patients, whereas the values for B lymphocytes, cytotoxic and noncytotoxic lymphocytes were significantly higher. Since these results persist in patients with and without infection, they suggest that these changes may be induced by alcohol.

The initial pro-inflammatory immune response is paralleled by elevated TLR4 expression 2 hours after starting the alcohol intake. Following an alcohol binge, the intestinal barrier is disrupted, enhancing the mucosal penetration of intestinal luminal toxic substances, pathogens and antigens, that in turn can lead to intestinal mucosal injury and inflammation (31). An increase of TLR4 in ileum and colon has been linked with increased intercellular permeability by the disruption of tight junctions between epithelial cells (32). Alcohol-induced loss of tight junctions allows the intestinal pathogens or pathogen-derived molecules to translocate into circulation, where they trigger the inflammatory cascade and activate immune cells such as monocytes and macrophages in TLR4-dependent manner, leading to a secretion of pro-inflammatory cytokines (31–33). Moreover, the intensity of alcohol intoxication positively correlates with serum levels of LPS and markers of monocyte activation (33). However, 24 hours after binge drinking, we have shown that the TLR4 expression on monocytes is downregulated and positively correlates with systemic IL-1 β levels measured at 48 hours following *ex vivo in vitro* LPS stimulation. The relative fraction of non-classical monocytes, which are comparable with murine anti-inflammatory Ly6C^{low} monocytes (27), recovered to the baseline at 24 hours. However, the immunosuppressive effect of alcohol seems to affect the functionality of individual monocyte subsets without changing their ratios at T48. In line with this, less monocytes are positive for reactive oxygen species at 48 hours after binge drinking, suggesting lower antimicrobial competence (25). Acute alcohol intoxication-related decrease in TLR4 response, so-called TLR4 tolerance, is induced by B-cell lymphoma 3-encoded protein (Bcl-3) that negatively regulates TNF- α transcription (34). Treatment of human monocytes and murine macrophages with 25 mM and 50 mM ethanol, respectively induces Bcl-3 expression that in turn enhances p50 homodimer stabilization. Bcl-3-p50 homodimer complex binds to TNF- α promoter region, inhibiting the TNF- α and consequently the NF- κ B transcriptional activity (34, 35). However, repeated alcohol intoxication such as chronic alcohol abuse abolishes the initial anti-inflammatory effect and leads to the loss of TLR4 tolerance (1), supporting the theory about the biphasic effect of alcohol.

We have shown that systemic IL-1 β level is below the detection limit following alcohol intoxication and that the amount of active caspase-1 does not significantly change in monocytes during the entire observation period. The release of IL-1 β upon inflammasome activation involves 2 major steps: 1) Synthesis of inactive pro-IL-1 β , 2) enzymatic cleavage of pro-IL-1 β into active IL-1 β by caspase-1 with subsequent secretion of IL-1 β into extracellular space (36). Since LPS-induced IL-1 β



decrease positively correlates with TLR4 surface presentation at T48, monocytes appear less responsive toward TLR4 ligands such as LPS and may mitigate the transcription and translation of pro-IL-1 β in NF- κ B-dependent manner. No alteration in caspase-1 levels suggests that inflammasome assembly was not impeded and the lower IL-1 β may be caused by the lack of inactive pro-IL-1 β . Although it is well known that IL-1 β is mainly produced by monocytic immune cells in NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)/Caspase-1-dependent manner, there is increasing evidence that IL-1 β can be produced by neutrophils or inflammasome-independently as well (37–39). Thus, a monocyte-independent production of IL-1 β following alcohol intoxication should be further investigated.

Ex vivo in vitro stimulation of monocytes with LPS and ATP significantly increases their caspase-1 level. During and following the excessive alcohol intake, caspase-1 expression is upregulated but significantly less induced compared to non-intoxicated HV. This is in line with an *in vitro* study, that we have published recently showing that ethanol pre-treatment (170 mM) of human HepG2 liver cells downregulated caspase-1 expression following LPS and ATP administration (22). This may be caused by innate immune memory (40), whereby the first hit (here alcohol) may reprogram the innate immune cells resulting in an adaptation of the response to the subsequent second hit (here LPS and ATP). However, the underlying mechanism remains elusive. Some studies show that this adaptation may be caused by the downregulation of TLR surface expression and an upregulation of Toll-interacting protein with subsequent hypophosphorylation of IL-1 receptor-associated kinase and downregulation of canonical NF- κ B pathway (41, 42). Moreover, acute alcohol intoxication leads to impaired adhesion of monocytes, whereby the subsequent *ex vivo in vitro* stimulation with LPS cannot at all or only barely increase the adhesive capacity compared to monocytes without endotoxin challenge. This may be caused by the lower surface presentation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 as shown in an *in vitro* study with polyphenols from red wine by Ferrero et al. (43). Polyphenols are non-alcoholic compounds of alcoholic beverages such as wine or whisky (44). Since de-alcoholized wine inhibits the monocyte migration *ex vivo* (45), we should consider that the effect we attribute to ethanol/alcohol may be also caused by other non-alcoholic compounds.

Limitations

This study has several strengths including pharmacologically relevant model for binge drinking and a novel approach to understanding the variability in monocyte subsets and the dynamic responses of these subsets as well as their functions following acute alcohol intoxication. However, this study also has several limitations. First, although we have shown a clear phenotypical shift of monocytes toward the anti-inflammatory phenotype in time-dependent manner, an analysis of the expression pattern of pro- and anti-inflammatory genes and of the altered functionality (e.g. phagocytosis and bacterial killing, generation of reactive oxygen species) would significantly improve these findings. This was not possible for technical and time reasons. Second, including a placebo group would immensely enhance the validity of the results. Until now, there are no short-term *in vivo* studies showing the impact of cola or its ingredients (sugar, phosphoric acid, carbonic acid etc.) on monocytes and the most *in vitro* studies focus on the long-term impact of glucose on monocyte functionality (diabetes models). Afshar et al. have shown in line with the data presented in this study that acute alcohol intoxication by ethanol mixed with chilled sugar-free flavored seltzer water led an early pro-inflammatory immune response 20 minutes after reaching blood alcohol concentration of 1‰ (7). Two and five hours later, an anti-inflammatory state was observed with reduced numbers of monocyte and natural killer cells, attenuated LPS-induced IL-1 β levels and a trend toward increased IL-10 levels (7). Further, *in vitro* studies with THP-1

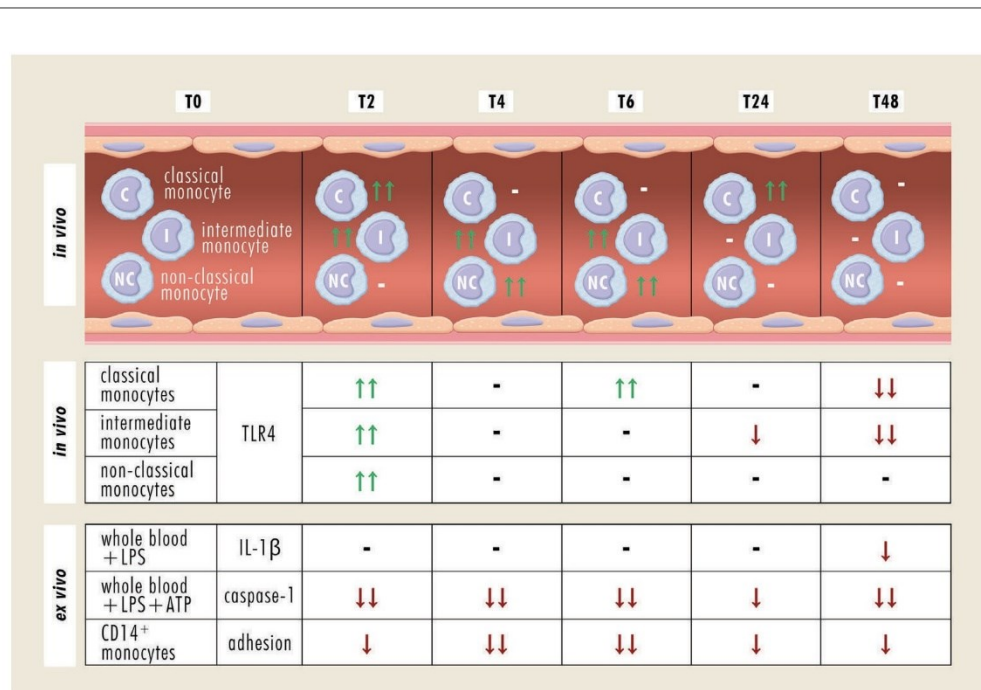


FIGURE 7 | Summary of phenotypical and functional changes of monocyte subsets following an acute alcohol intoxication. -, no change; ↑↑, significant increase; ↓↓, significant decrease; ↓, decreasing trend; ATP, adenosine triphosphate; CD, cluster of differentiation; IL-1β, Interleukine-1β; LPS, lipopolysaccharide; TLR4, Toll-like receptor 4.

describe increased secretion of IL-1β in glucose dose- and time-dependent manner, that is paralleled by enhanced adhesion capacity (46, 47). Although these opposite results to our study cannot definitely exclude that cola might have anti-inflammatory features on monocyte subsets and functions, it considerably supports our conclusion that these effects are attributed to alcohol. Third, the calculated absolute cell numbers of monocyte subsets are artificial. Since we did not use cell counting beads, we obtained only the relative fractions of monocyte subsets. Thus, for getting the absolute cell numbers, we calculated those out of leukocytes counted by automated blood cell counter (Sysmex Europe GmbH, Germany). Lastly, although density gradient centrifugation by using Bicol as a separation medium is a standard method for immune cell isolation for diverse immunological investigations, such as evaluation of the inflammasome activation in monocytes (48, 49), we cannot exclude a monocyte activation by the density gradient centrifugation itself or by direct or indirect interactions with lymphocytes and platelets, which have been shown to undergo phenotypical and functional changes following a density gradient centrifugation (50–52).

CONCLUSIONS

Taking together, an acute intoxication with alcohol induces monocyte conversion toward their pro-inflammatory phenotype in the very early phase upon drinking. In the later time course, they differentiate into anti-inflammatory monocytes, findings that

are paralleled by downregulation of TLR4 expression and IL-1β release. Our results suggest that an acute intoxication with alcohol has immunosuppressive effects in a time-dependent manner. Therefore, along with the endotoxin tolerance, excessively alcoholized subjects may be susceptible to the development of secondary infections. *Ex vivo in vitro* LPS stimulation of monocytes shows a downregulation of NLRP3 expression in samples obtained from severely injured patients compared to healthy subjects (53). This in turn elicits the synthesis and release of active IL-1β (53), whereby the monocyte deactivation correlates with the injury severity (54). In a rat model of blunt chest thorax trauma and hemorrhagic shock with subsequent resuscitation, monocytes express lower levels of caspase-1 in response to ethanol administration 2 hours before injury (21). Accordingly, alcohol intoxication may synergize with later trauma-induced immunosuppression leading to further enhanced vulnerability to infectious complications in the clinical course and has to be elaborated in further studies. It remains controversial whether an acute intoxication with alcohol has an impact on the outcome after a major injury, however, an adjustment of the timing of life-saving intervention according to the immune response may improve the therapeutic approach.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by ethics committee approval (255/14) from the University Hospital of the Goethe-University Frankfurt. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR designed the study, obtained the ethical approval, performed statistical analyses, and revised the manuscript. RS, FH, BX, and AJ collected the samples and performed the experiments. AJ and RS performed the statistical analyses, and AJ wrote the original draft. AG, ID, CN, AN, and PC contributed to analyses and revised the manuscript. ID, CN, and IM contributed

intellectually to the completion of the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant nos. DFG RE 3304/5-1, DFG RE 3304/9-1, DFG NE 1932/1-3 and Nachwuchsförderung AO Trauma Deutschland (R.S.)).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.652488/full#supplementary-material>

Supplementary Table 1 | Calculated absolute monocyte numbers and their subsets.

REFERENCES

- Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res* (2015) 37:159–70.
- Piano MR. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res* (2017) 38:219–41.
- Gomes de Matos E, Atzendorf J, Kraus L, Piontek D. Substanzkonsum in Der Allgemeinbevölkerung in Deutschland. *Sucht* (2016) 62:271–81. doi: 10.1024/0939-5911/a000445
- John U, Hanke M. Alcohol-Attributable Mortality in a High Per Capita Consumption Country – Germany. *Alcohol Alcohol* (2002) 37:581–5. doi: 10.1093/alcalc/37.6.581
- Hadfield RJ, Mercer M, Parr MJ. Alcohol and Drug Abuse in Trauma. *Resuscitation* (2001) 48:25–36. doi: 10.1016/s0300-9572(00)00315-4
- Hildebrand F, Pape HC, van Griensven M, Meier S, Hasenkamp S, Krettek C, et al. Genetic Predisposition for a Compromised Immune System After Multiple Trauma. *Shock* (2005) 24:518–22. doi: 10.1097/01.shk.0000184212.97488.4e
- Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, et al. Acute Immunomodulatory Effects of Binge Alcohol Ingestion. *Alcohol* (2015) 49:57–64. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.10.002
- Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-Dependent Effects of Ethanol on the Innate Immune System. *Alcohol* (2008) 42:237–47. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.02.003
- Pruett BS, Pruett SB. An Explanation for the Paradoxical Induction and Suppression of an Acute Phase Response by Ethanol. *Alcohol* (2006) 39:105–10. doi: 10.1016/j.alcohol.2006.08.003
- Relja B, Menke J, Wagner N, Auner B, Voth M, Nau C, et al. Effects of Positive Blood Alcohol Concentration on Outcome and Systemic Interleukin-6 in Major Trauma Patients. *Injury* (2016) 47:640–5. doi: 10.1016/j.injury.2016.01.016
- Sureshchandra S, Raus A, Jankeel A, Ligh BJK, Walter NAR, Newman N, et al. Dose-Dependent Effects of Chronic Alcohol Drinking on Peripheral Immune Responses. *Sci Rep* (2019) 9:7847. doi: 10.1038/s41598-019-44302-3
- Neupane SP, Skulberg A, Skulberg KR, Aass HC, Bramness JG. Cytokine Changes Following Acute Ethanol Intoxication in Healthy Men: A Crossover Study. *Mediators Inflammation* (2016) 2016:3758590. doi: 10.1155/2016/3758590
- Muralidharan S, Lim A, Catalano D, Mandrekar P. Human Binge Alcohol Intake Inhibits TLR4-MyD88 and TLR4-TRIF Responses But Not the TLR3-TRIF Pathway: HspA1A and PP1 Play Selective Regulatory Roles. *J Immunol* (2018) 200:2291–303. doi: 10.4049/jimmunol.1600924
- 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) 30:135–9. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00012.x
- Kapellos TS, Bonaguro L, Gemund I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* (2019) 10:2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035
- Greco M, Mazzei A, Palumbo C, Verri T, Lobreglio G. Flow Cytometric Analysis of Monocytes Polarization and Reprogramming From Inflammatory to Immunosuppressive Phase During Sepsis. *EJIFCC* (2019) 30:371–84.
- Donnadieu-Rigole H, Mura T, Portales P, Duroux-Richard I, Bouthier M, Eliaou JF, et al. Effects of Alcohol Withdrawal on Monocyte Subset Defects in Chronic Alcohol Users. *J Leukoc Biol* (2016) 100:1191–9. doi: 10.1189/jlb.5A0216-060RR
- von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for Reporting Observational Studies. *J Clin Epidemiol* (2008) 61:344–9. doi: 10.1016/j.jclinepi.2007.11.008
- Sturm R, Haag F, Janicova A, Xu B, Vollrath JT, Bundkirchen K, et al. Acute alcohol consumption increases systemic endotoxin bioactivity for days in healthy volunteers-with reduced intestinal barrier loss in female. *Eur J Trauma Emerg Surg* (2021). doi: 10.1007/s00068-021-01666-4
- Wagner N, Dieteren S, Franz N, Kohler K, Perl M, Marzi I, et al. Alcohol-induced Attenuation of Posttraumatic Inflammation is Not Necessarily Liverprotective Following Trauma/Hemorrhage. *Int J Mol Med* (2019) 44:1127–38. doi: 10.3892/ijmm.2019.4259
- Franz N, Dieteren S, Kohler K, Mors K, Sturm R, Marzi I, et al. Alcohol Binge Reduces Systemic Leukocyte Activation and Pulmonary Pmn Infiltration After Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock. *Inflammation* (2019) 42:690–701. doi: 10.1007/s10753-018-0927-z
- Horau JA, Kany S, Janicova A, Xu B, Vrdoljak T, Sturm R, et al. Short Exposure to Ethanol Diminishes Caspase-1 and ASC Activation in Human Hepg2 Cells In Vitro. *Int J Mol Sci* (2020) 21:3196. doi: 10.3390/ijms21093196
- Janicova A, Becker N, Xu B, Wutzler S, Vollrath JT, Hildebrand F, et al. Endogenous Uteroglobin as Intrinsic Anti-Inflammatory Signal Modulates Monocyte and Macrophage Subsets Distribution Upon Sepsis Induced Lung Injury. *Front Immunol* (2019) 10:2276. doi: 10.3389/fimmu.2019.02276
- Relja B, Omid N, Schaible A, Perl M, Meier S, Oppermann E, 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) 12:2991–8. doi: 10.3892/mmr.2015.3764
- Haag F, Janicova A, Xu B, Powerski M, Facht M, Bundkirchen K, et al. Reduced Phagocytosis, ROS Production and Enhanced Apoptosis of Leukocytes Upon Alcohol Drinking in Healthy Volunteers. *Eur J Trauma Emerg Surg* (2021). doi: 10.1007/s00068-021-01643-x
- Burnham EL, Moss M, Martin GS. The Effect of Alcohol Consumption on Risk for Sepsis and ARDS. In: Vincent JL (eds). *Intensive Care Medicine*. New York, NY: Springer (2003). doi: 10.1007/978-1-4757-5548-0_9

27. Kratoofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2017) 37:35–42. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308198
28. Ren Z, Wang X, Xu M, Yang F, Frank JA, Ke ZJ, et al. Binge Ethanol Exposure Causes Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress and Tissue Injury in the Pancreas. *Oncotarget* (2016) 7:54303–16. doi: 10.18632/oncotarget.111103
29. Zhang K, Wang H, Xu M, Frank JA, Luo J. Role of MCP-1 and CCR2 in Ethanol-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration in the Developing Brain. *J Neuroinflamm* (2018) 15:197. doi: 10.1186/s12974-018-1241-2
30. Gacouin A, Roussel M, Le Priol J, Azzaoui I, Uhel F, Fest T, et al. Acute Alcohol Exposure has an Independent Impact on C-reactive Protein Levels, Neutrophil CD64 Expression, and Subsets of Circulating White Blood Cells Differentiated by Flow Cytometry in Nontrauma Patients. *Shock* (2014) 42:192–8. doi: 10.1097/SHK.0000000000000195
31. Anton M, Rodriguez-Gonzalez A, Ballesta A, Gonzalez N, Del Pozo A, de Fonseca FR, et al. Alcohol Binge Disrupts the Rat Intestinal Barrier: The Partial Protective Role of Oleoylethanolamide. *Br J Pharmacol* (2018) 175:4464–79. doi: 10.1111/bph.14501
32. Li X, Wang C, Nie J, Lv D, Wang T, Xu Y. Toll-Like Receptor 4 Increases Intestinal Permeability Through Up-Regulation of Membrane PKC Activity in Alcoholic Steatohepatitis. *Alcohol* (2013) 47:459–65. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.05.004
33. Liangpunsakul S, Toh E, Ross RA, Heathers LE, Chandler K, Oshodi A, et al. Quantity of Alcohol Drinking Positively Correlates With Serum Levels of Endotoxin and Markers of Monocyte Activation. *Sci Rep* (2017) 7:4462. doi: 10.1038/s41598-017-04669-7
34. Bala S, Tang A, Catalano D, Petrasek J, Taha O, Kodys K, et al. Induction of Bcl-3 by Acute Binge Alcohol Results in Toll-Like Receptor 4/LPS Tolerance. *J Leukoc Biol* (2012) 92:611–20. doi: 10.1189/jlb.0112050
35. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative Regulation of Toll-Like Receptor Signaling by NF-kappaB p50 Ubiquitination Blockade. *Science* (2007) 317:675–8. doi: 10.1126/science.1142953
36. Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta Release. *Immunobiology* (2009) 214:543–53. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.007
37. Bakele M, Joos M, Burdi S, Allgaier N, Poschel S, Fehrenbacher B, et al. Localization and Functionality of the Inflammasome in Neutrophils. *J Biol Chem* (2014) 289:5320–9. doi: 10.1074/jbc.M113.505636
38. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-family Cytokines. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:49–77. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112306
39. Provoost S, Maes T, Pauwels NS, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Lambrecht BN, et al. NLRP3/Caspase-1-Independent IL-1beta Production Mediates Diesel Exhaust Particle-Induced Pulmonary Inflammation. *J Immunol* (2011) 187:3331–7. doi: 10.4049/jimmunol.1004062
40. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease. *Science* (2016) 352:aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098
41. Mors K, Harauf JA, Kany S, Wagner N, Sturm R, Woschek M, et al. Ethanol Decreases Inflammatory Response in Human Lung Epithelial Cells by Inhibiting the Canonical NF-Kb-Pathway. *Cell Physiol Biochem* (2017) 43:17–30. doi: 10.1159/000480313
42. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of Cross Hyporesponsiveness to Toll-like Receptor Bacterial Ligands in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* (2004) 126:1054–70. doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.007
43. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, et al. Activity In Vitro of Resveratrol on Granulocyte and Monocyte Adhesion to Endothelium. *Am J Clin Nutr* (1998) 68:1208–14. doi: 10.1093/ajcn/68.6.1208
44. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, et al. The Effect of Whisky and Wine Consumption on Total Phenol Content and Antioxidant Capacity of Plasma From Healthy Volunteers. *Eur J Clin Nutr* (1998) 52:733–6. doi: 10.1038/sj.ejcn.1600635
45. Imhof A, Blagieva R, Marx N, Koenig W. Drinking Modulates Monocyte Migration in Healthy Subjects: A Randomised Intervention Study of Water, Ethanol, Red Wine and Beer With or Without Alcohol. *Diabetes Vasc Dis Res* (2008) 5:48–53. doi: 10.3132/dvdr.2008.009
46. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High Glucose Induces IL-1beta Expression in Human Monocytes: Mechanistic Insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) 293:E337–46. doi: 10.1152/ajpendo.00718.2006
47. Nandy D, Janardhanan R, Mukhopadhyay D, Basu A. Effect of Hyperglycemia on Human Monocyte Activation. *J Investig Med* (2011) 59:661–7. doi: 10.2310/JIM.0b013e31820ee432
48. Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georjgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, et al. Impact of Human Monocyte and Macrophage Polarization on NLR Expression and NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS One* (2017) 12:e0175336. doi: 10.1371/journal.pone.0175336
49. Lage SL, Dominical VM, Wong CS, Sereti I. Evaluation of Canonical Inflammasome Activation in Human Monocytes by Imaging Flow Cytometry. *Front Immunol* (2019) 10:1284. doi: 10.3389/fimmu.2019.01284
50. Dayer JM. How T-lymphocytes are Activated and Become Activators by Cell-Cell Interaction. *Eur Respir J Suppl* (2003) 44:10s–5s. doi: 10.1183/09031936.03.00000403b
51. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet Interaction With Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemother* (2016) 43:78–88. doi: 10.1159/000444807
52. Lin SJ, Chao HC, Yan DC, Huang YJ. Expression of Adhesion Molecules on T Lymphocytes in Young Children and Infants—a Comparative Study Using Whole Blood Lysis or Density Gradient Separation. *Clin Lab Haematol* (2002) 24:353–9. doi: 10.1046/j.1365-2257.2002.00462.x
53. Kany S, Horstmann JP, Sturm R, Mors K, Relja B. Reduced NLRP3 Gene Expression Limits the IL-1beta Cleavage Via Inflammasome in Monocytes From Severely Injured Trauma Patients. *Mediators Inflammation* (2018) 2018:1752836. doi: 10.1155/2018/1752836
54. West SD, Mold C. Monocyte Deactivation Correlates With Injury Severity Score, But Not With Heme Oxygenase-1 Levels in Trauma Patients. *J Surg Res* (2012) 172:5–10. doi: 10.1016/j.jss.2011.04.016

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Janicova, Haag, Xu, Garza, Dunay, Neunaber, Nowak, Cavalli, Marzi, Sturm and Relja. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

13.3 Publikation 3:

Sturm R., **Haag F.**, Janicova A., Xu B., Vollrath J.T., Bundkirchen K., Dunay I.R., Neunaber C., Marzi I., Relja B.:

Acute alcohol consumption increases systemic endotoxin bioactivity for days in healthy volunteers – with reduced intestinal barrier loss in female.

Eur J Trauma Emerg Surg. 2021 Apr 11. doi: 10.1007/s00068-021-01666-4. PMID: 33839799



Acute alcohol consumption increases systemic endotoxin bioactivity for days in healthy volunteers—with reduced intestinal barrier loss in female

Ramona Sturm¹ · Florian Haag^{1,2} · Andrea Janicova² · Baolin Xu² · Jan Tilmann Vollrath¹ · Katrin Bundkirchen³ · Ildiko Rita Dunay⁴ · Claudia Neunaber³ · Ingo Marzi¹ · Borna Relja^{1,2}

Received: 23 December 2020 / Accepted: 1 April 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Objective Trauma is the most common cause of death among young adults. Alcohol intoxication plays a significant role as a cause of accidents and as a potent immunomodulator of the post-traumatic response to tissue injury. Polytraumatized patients are frequently at risk to developing infectious complications, which may be aggravated by alcohol-induced immunosuppression. Systemic levels of integral proteins of the gastrointestinal tract such as syndecan-1 or intestinal fatty acid binding proteins (FABP-I) reflect the intestinal barrier function. The exact impact of acute alcohol intoxication on the barrier function and endotoxin bioactivity have not been clarified yet.

Methods 22 healthy volunteers received a precisely defined amount of alcohol (whiskey–cola) every 20 min over a period of 4 h to reach the calculated blood alcohol concentration (BAC) of 1‰. Blood samples were taken before alcohol drinking as a control, and after 2, 4, 6, 24 and 48 h after beginning with alcohol consumption. In addition, urine samples were collected. Intestinal permeability was determined by serum and urine values of FABP-I, syndecan-1, and soluble (s)CD14 as a marker for the endotoxin translocation via the intestinal barrier by ELISA. BAC was determined.

Results Systemic FABP-I was significantly reduced 2 h after the onset of alcohol drinking, and remained decreased after 4 h. However, at 6 h, FABP-I significantly elevated compared to previous measurements as well as to controls ($p < 0.05$). Systemic sCD14 was significantly elevated after 6, 24 and 48 h after the onset of alcohol consumption ($p < 0.05$). Systemic FABP-I at 2 h after drinking significantly correlated with the sCD14 concentration after 24 h indicating an enhanced systemic LPS bioactivity. Women showed significantly lower levels of syndecan-1 in serum and urine and urine for all time points until 6 h and lower FABP-I in the serum after 2 h.

Conclusions Even relative low amounts of alcohol affect the immune system of healthy volunteers, although these changes appear minor in women. A potential damage to the intestinal barrier and presumed enhanced systemic endotoxin bioactivity after acute alcohol consumption is proposed, which represents a continuous immunological challenge for the organism and should be considered for the following days after drinking.

Keywords Alcohol · Barrier · FABP · SCD14 · Syndecan-1 · Gender

✉ Borna Relja
Borna.Relja@med.ovgu.de

¹ Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Goethe University, Frankfurt, Germany

² Experimental Radiology, Department of Radiology and Nuclear Medicine, Otto Von Guericke University, Magdeburg, Germany

³ Trauma Department, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴ Institute of Inflammation and Neurodegeneration, Otto Von Guericke University, Magdeburg, Germany

Introduction

Trauma is the leading cause of death among young adults [1, 2], while alcohol use accounts as a major cause of accidents [3]. Among alcohol-related accidents, road traffic injuries are leading, followed by self-harm, interpersonal violence and falls [4]. In Germany, a blood alcohol level of 0.5 per mille is currently permitted in road traffic to prevent drink-driving [5]. The limit value of 0.5 and 0.8 per mille is frequently used in international comparisons, whereas some countries have no limitation of blood alcohol concentration

in road traffic [6]. The percentage of alcoholised polytraumatized patients, depending on the study, averages at > 25% [7]. Patients who initially survive an acute and relevant blood loss, massive tissue injury, or severe traumatic brain injury (TBI) are at high risk for developing post-traumatic imbalance of immunological mediators and immune cells, which may result in inflammatory complications, such as sepsis or multiple organ failure [8, 9]. In alcoholised polytraumatized patients and alcoholised patients with TBI reduced leukocyte numbers and lowered systemic interleukin (IL)-6 levels [7, 10] indicating an immunosuppressive effect of alcohol have been reported. In this context, damaged intestinal barrier and alcohol use play also decisive roles [11]. The mortality after surgical interventions is increased in severely traumatized patients with acute alcohol intoxication [12]. Studies indicate that acute alcohol intoxication reduces the lipopolysaccharide (LPS)-induced production and release of proinflammatory cytokines and contributes to the development of Toll-like receptor (TLR)4/endotoxin (LPS) tolerances in the murine approach [13].

As a result of damaged enterocytes and thus the intestinal barrier after, e.g., trauma or hypoperfusion (shock), membrane and intracellular proteins are released into the extracellular space and subsequently into the circulation and urine [14]. Furthermore, a damaged intestinal barrier promotes the translocation of damage-associated molecular pattern or bacteria as well. Fatty acid binding proteins (FABPs) are a group of nine partially tissue-specific transport proteins that are localized intracellularly or in the cytoplasmic membrane of different cells [15]. The FABP-I or FABP2 are specifically expressed in enterocytes in the small intestine and occasionally in the colon [16]. Recently, it was shown that FABP-I can be used as an early biomarker for the detection of abdominal injuries in general and specifically for intestinal injuries [17]. Elevated FABP-I level evaluated early after trauma depends on the tissue injury pattern and the presence of shock as well, which is associated with a barrier breakdown [18]. Moreover, the FABP-I in urine and serum may serve as a biomarker for diagnosis of acute mesenteric ischemia [19, 20] and can predict mortality and bowel ischemia in patients with septic shock [21]. Syndecan-1 (CD138) as a transmembrane heparan sulphate proteoglycan is expressed predominantly on the basolateral surface of epithelial cells and plasma cells [22]. As a transmembrane protein with extracellular and cytoplasmic domains, syndecan-1 is involved in cell–matrix interactions with cell binding, cell migration and cytoskeletal organization as well as in cell proliferation and cell signalling [23]. In severely injured patients, syndecan-1 has been shown to be elevated in serum associated with subsequent sepsis [24]. CD14 is a surface antigen on monocytes and macrophages and exists in a membrane-bound or soluble form. The soluble (s)CD14 binds LPS and transfers it to the membrane-bound CD14,

which serves as a co-receptor for the TLR4-receptor complex. Moreover, sCD14 can transfer the LPS directly to the TLR4-receptor complex [25, 26]. Furthermore, sCD14 seems to neutralize LPS by binding and limiting the amount of monocyte-bound LPS. This may lead to a reduction of the inflammatory response [27]. Soluble CD14 can be used as a biomarker for the LPS bioactivity. Following traumatic injury, intestinal bacteria or bacterial components (e.g., LPS) can translocate into blood circulation where they trigger a proinflammatory response [28].

Chronic alcohol consumption alters the intestinal flora and can further lead to a malfunction and intestinal hyperpermeability [29]. Little is known about the direct impact of acute alcohol consumption on the intestinal barrier, permeability and effects of the immune system, in particular the differences between men and women are unknown.

Since acute alcohol consumption induces immunosuppression and is associated with infectious complications, the aim of the present study was to evaluate the dose- and time-dependent effects of acute alcohol consumption on the intestinal barrier and the immunological changes.

Patients and methods

Ethics

This study was performed in accordance with the institutional ethics committee approval (255/14) from the University Hospital of the Goethe University Frankfurt, in accordance with the Declaration of Helsinki and following the Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology-guidelines [30]. All healthy volunteers signed the written informed consent form accordance to the ethical standards after detailed explanation of the procedure, effects and objectives of the investigations.

Study population

Twelve female and ten male healthy volunteers between 18 and 50 years were enrolled. Exclusion criteria were chronic alcohol consumption, pre-existing immunological disorders, chronic inflammatory and explicitly chronic intestinal diseases, HIV and infectious hepatitis or immune-suppressive medication. A detailed alcohol anamnesis was taken, including the standardized “Alcohol Use Disorders Identification Test” to exclude regular and chronic alcohol consumption. Furthermore, hepatic and renal insufficiencies were previously excluded by blood examination.

Healthy volunteers, who received a standardized lunch 1 hour before the experiment, drank an individually calculated amount of alcohol, which should lead to a blood alcohol level of 1‰ after the end of consumption. The calculation

was made according to the modified Widmark equation depending on age, sex, height and weight. Every 20 min over 4 h equal mixed drinks consisting of whisky (Tennessee Whiskey Jack Daniels, 40%) and cola (Coca-Cola) in a mixing ratio of 1:2 were drunk. Subsequently, a 2-h monitoring phase without further alcohol consumption followed. All study participants drank 1 l of water during the first 6 h of the experiments. The experimental design is shown in Fig. 1.

Blood sampling

Blood samples were taken before alcohol consumption (T0) as a control and after 2 h (T2), 4 h (T4), 6 h (T6), 24 h (T24) and 48 h (T48) after beginning of alcohol consumption. The blood was withdrawn in serum-gel tubes (Sarstedt, Nürmbrecht, Germany) and centrifuged immediately after collection at $2,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Furthermore, the serum alcohol concentration was determined by the clinical laboratory.

Urine sampling

Before starting the experiment, urine was delivered, centrifuged and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (at T0). From T0 to T2, as well as from T2 to T4 and from T4 to T6, the urine was collected in separate containers, centrifuged at $2,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Measurement of FABP-I, syndecan-1 and sCD14

Both serum and urine samples were thawed for direct use and measurement of FABP-I, syndecan-1 and sCD14. According to manufacturer's instructions, Human FABP2/I-FABP DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R and D Systems, Minneapolis, USA, #DY3078) was used to measure intestinal FABP and Syndecan-1 DuoSet ELISA (R and D Systems, Minneapolis, USA, #DY2780) was used to measure syndecan-1 concentrations in serum and urine. Human CD14 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA, #DY383) was

utilized according to manufacturer's instructions to measure sCD14 concentrations in serum and urine.

Statistical analysis

GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis. Data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). The Kruskal–Wallis test with a Dunn's post hoc test was applied to compare the differences between the groups. Spearman's correlation coefficient was calculated to determine correlations. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

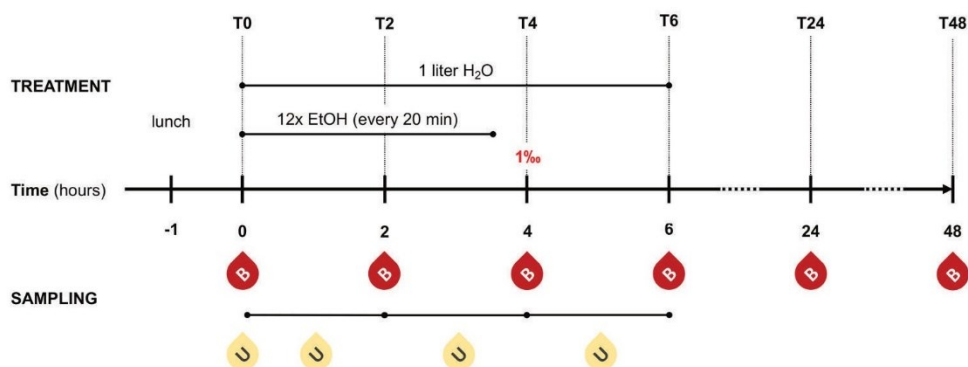
Study population

Twenty-two healthy volunteers were enrolled in this study. The mean age was 25 ± 4 years. 10 out of 22 patients were male (45.45%). The experimental design is shown in Fig. 1.

Blood alcohol concentration

All volunteers had no measurable blood alcohol concentration at the beginning of the experiment. At T2 the legally permissible alcohol level (0.5‰) for the road traffic had nearly been reached. The BAC increased significantly at T2 to $0.46 \pm 0.02\text{‰}$ compared to T0 ($p < 0.05$, Fig. 2a). After T4, the aim concentration with $1.11 \pm 0.05\text{‰}$ was reached (Fig. 2a). 2 h after the end of alcohol consumption (T6), the BAC dropped to $0.83 \pm 0.06\text{‰}$ still being significantly enhanced compared to T0 ($p < 0.05$, Fig. 2a). At T24 and T48, no BAC was detectable. There were no significant gender-specific differences among the BAC levels (Fig. 2b).

Fig. 1 Experimental design. Before alcohol (ethanol, EtOH) drinking (T0), 2 h (T2), 4 h (T4), 6 h (T6), 24 h (T24) and 48 h (T48) after start of alcohol consumption sampling of either blood (B) or urine (U) from healthy volunteers was performed. The aim blood alcohol concentration of one per mille (1‰) was reached at T4



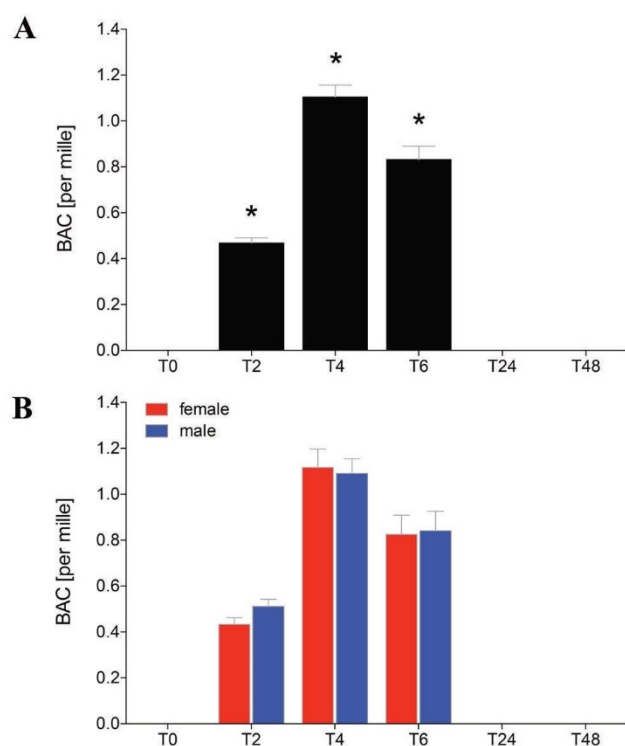


Fig. 2 Blood alcohol concentration (BAC) in sera of healthy volunteers before, during and after alcohol drinking. Mean BAC as per mille determined in sera from healthy volunteers before (T0), 2 h (T2), 4 h (T4), 6 h (T6), 24 h (T24) and 48 h (T48) after start of alcohol consumption are given. **a** Data from all healthy volunteers ($n=22$), and **b** gender-specific results are shown (female: $n=12$ and male: $n=10$). The data are presented as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T0

FABP-I in serum and urine

Before alcohol intake, the intestinal FABP in serum of healthy volunteers was 441.30 ± 44.15 pg/ml (Fig. 3a). At T2 and T4 after beginning of acute alcohol consumption, the FABP-I in serum was significantly reduced compared to T0 (T2: 355.90 ± 35.44 or T4: 338.50 ± 38.40 vs. T0: 441.30 ± 44.15 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 3a). At T6, the intestinal FABP was significantly increased compared to T0 (T6: 552.20 ± 56.83 vs. T0: 441.30 ± 44.15 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 3a). The levels of intestinal FABP remained elevated for the next 2 days at T24 and T48, however, no statistical difference was found. Gender-specific analyses showed a significant difference between men and women at T2 with higher levels in men ($p < 0.05$, Fig. 3b).

The urinary level of 16.24 ± 3.90 pg/ml of intestinal FABP has been detected in healthy volunteers before alcohol consumption (Fig. 3c). In the collected urine at T4, the FABP-I concentration was significantly reduced compared to T0 (T4: 5.06 ± 3.40 vs. T0: 16.24 ± 3.90 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 3c). At T6, the FABP-I levels increased to normal values (Fig. 3c).

The gender-specific analyses have shown no differences between men and women over the observational time course (Fig. 3d).

Syndecan-1 in serum and urine

Beside in healthy volunteers, there were no significant differences among the serum concentrations of syndecan-1 during the observational period compared to normal values detected at T0 before alcohol administration (2.15 ± 0.56 ng/ml, Fig. 4a). However, the gender-specific values were significantly higher in men compared to women during the observational period between time points T0 and T6 ($p < 0.05$, Fig. 4b).

The urine levels of syndecan-1 before alcohol consumption at T0 were at 3.39 ± 0.24 ng/ml (Fig. 4c). In the collected urine at T4, the syndecan-1 concentration was significantly reduced compared to T0 (T4: 2.33 ± 0.21 vs. T0: 3.39 ± 0.24 ng/ml, $p < 0.05$, Fig. 4c). After alcohol consumption, the syndecan-1 values in the urine increased again to levels comparable with T0 controls (Fig. 4c). The concentrations of syndecan-1 were significantly reduced in women compared with men at all evaluated time points ($p < 0.05$, Fig. 4d).

Soluble CD14 in serum

Before alcohol administration, the serum level of sCD14 in healthy volunteers was 3432.00 ± 258.40 ng/ml (Fig. 5a). At T2 and T4, the sCD14 in serum increased continuously compared to T0. At T6, the sCD14 was significantly increased compared to T0 (T6: 4388.00 ± 398.50 vs. T0: 3432.00 ± 258.40 ng/ml, $p < 0.05$, Fig. 5a). The levels of sCD14 remained elevated at T24 and T48 compared to T0 (T24: 5363.00 ± 312.50 or T48: 5300.00 ± 324.20 vs. T0: 3432.00 ± 258.40 ng/ml, $p < 0.05$, Fig. 5a). The gender-specific analyses have shown significant higher levels of sCD14 in women compared to men at T0 (Fig. 5b). In the further time course of alcohol intake there were no significant gender-specific differences (Fig. 5b).

Correlation of FABP-I and sCD14 in serum

The Spearman's rank correlation showed a significant correlation for systemic FABP-I levels at T2 and sCD14 at T24 ($p < 0.05$, Spearman $r = 0.8182$, Fig. 6). No further correlations were found for other parameters or time points.

Discussion

The immunological response to acute alcohol intoxication co-determines the clinical course of patients after severe injuries and/or surgical interventions. The existing studies

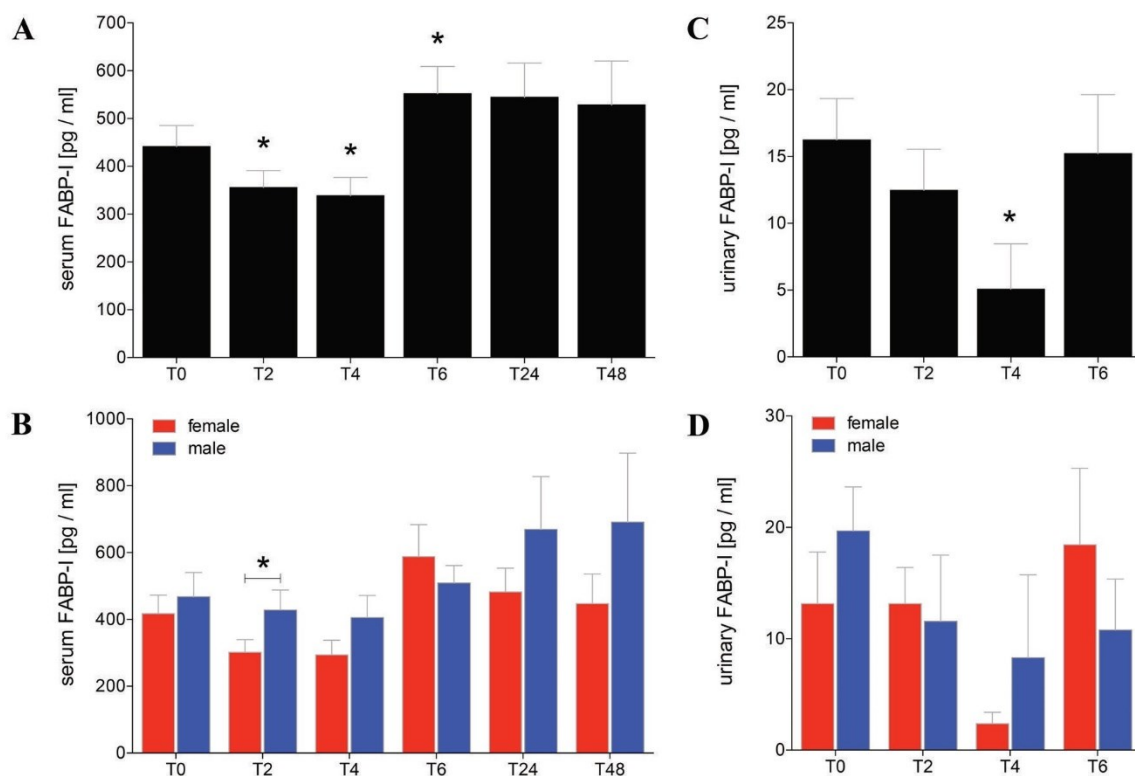


Fig. 3 Levels of intestinal fatty-acid binding protein (FABP-I) in sera and urine of healthy volunteers before, during and after alcohol consumption. Mean values of intestinal FABP in pg/ml determined in sera (**a, b**) or urine (**c, d**) from healthy volunteers before (T0), 2 h (T2), 4 h (T4), and 6 h (T6) after start of alcohol consumption are given. 24 h (T24) and 48 h (T48) after experimentation, FABP-I was determined in sera as well. Urine samples were analysed before alco-

hol consumption (T0), collected and pooled over the first 2 h (T2), from T2 until the following 2 h (T4), and from T4 until T6 (T6). **a, c** Data from all healthy volunteers ($n=22$) are shown, and **b, d** gender-specific results are shown (female: $n=12$ and male: $n=10$). The data are presented as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T0 or in B vs. indicated groups

show different results in the outcome of alcoholised patients, but they do not provide exact indications for the underlying cellular mechanism of alcohol-induced immunomodulation. Furthermore, the extent of potentially alcohol-induced damage of the intestinal barrier and its difference in healthy men and women after drinking is not yet known. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunological changes following acute alcohol intake in healthy subjects especially affecting the intestinal barrier in a time- and dose-dependent manner. The concentrations of specific markers of the intestinal barrier integrity FABP-I and syndecan-1 were measured in both serum and urine. Systemic endotoxin activity was evaluated by sCD14 levels.

In our cohort of healthy volunteers was an almost balanced gender distribution. By adjusting the alcohol concentration using the modified Widmark equation, there were no differences in the blood alcohol concentration between both sexes (Fig. 2b). To imitate a typical drinking behavior with corresponding physiological parameters, alcohol intake was induced in all subjects at the same time in the early evening. In addition, the alcohol intake was persisting over a period of

hours to simulate the physiological conditions and drinking behavior. The study participants reached already at 2 h after drinking a legally permitted alcohol level (Fig. 2a).

Numerous studies have shown that FABP-I can be used as a non-invasive marker for intestinal diseases like celiac disease [31] or intestinal ischemia [32] and also for intestinal damage in severely injured patients [17]. In the present study, the FABP-I concentration decreased significantly very early after alcohol consumption. However, serum FABP-I concentrations were significantly elevated after 6 h and remains enhanced over the next 2 days (Fig. 3a). The primary decrease of the FABP concentration in serum may be caused by an initially delayed transport and resorption of the alcohol with a full stomach and reduced motility. This decrease in the FABP concentration was mainly present in women, which in turn significantly influence the overall result. The absence of a significant differences among later time points T24 and T48 may be caused by the lower number of included healthy volunteers since several participants did not show up for further blood withdrawals. A similar decrease in urine FABP-I concentration was detected at T4

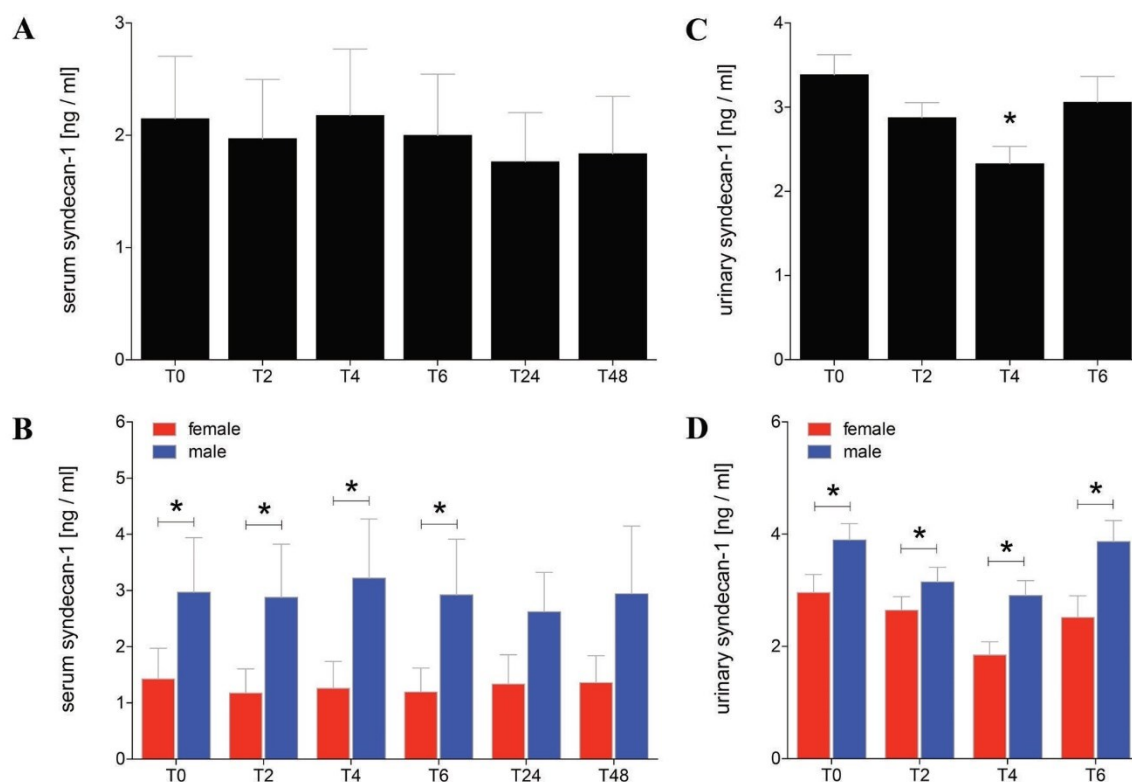


Fig. 4 Syndecan-1 levels in sera and urine of healthy volunteers before, during and after alcohol consumption. Mean values of syndecan-1 in ng/ml determined in sera (**a, b**) or urine (**c, d**) from healthy volunteers before (T0), 2 h (T2), 4 h (T4), and 6 h (T6) after start of alcohol consumption are given. 24 h (T24) and 48 h (T48) after experimentation, syndecan-1 was determined in sera as well. Urine samples were analysed before alcohol consumption (T0), col-

lected and pooled over the first 2 h (T2), from T2 until the following 2 h (T4), and from T4 until T6 (T6). **a, c** Data from all healthy volunteers ($n=22$) are shown, and **b, d** gender-specific results are shown (female: $n=12$ and male: $n=10$). The data are presented as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T0 or in **b, d** vs. indicated groups

(Fig. 3c). Serum values indicate damage to the intestinal barrier in the early phase after alcohol intoxication.

Interestingly, it has been shown that severely injured women have a better outcome than men with comparable injury patterns [33]. The underlying mechanism is still unexplained. Hundscheid et al. demonstrated that the small intestine of female is more resistant to reperfusion-related intestinal damage than that of men [34]. Our data show lower serum FABP-I concentration 2 h after alcohol consumption in women, potentially underlining the above-mentioned study results (Fig. 3b). Furthermore, women showed lower syndecan-1 concentrations in both blood and urine before, during and 2 h after alcohol consumption as well (Fig. 4b, d). In addition, higher levels of sCD14 in women under normal conditions compared to men were found (Fig. 5b). In absolute terms, women consumed less volume of alcohol compared to men. However, calculating the amount of alcohol, both height and weight were included resulting in a comparable BAC without differences between both gender.

In non-cirrhotic alcoholics, the intestinal barrier breakdown and systemic LPS were observed and 2 weeks after

admission to a detoxification program, the patients still exhibited an increase of proinflammatory cytokines and persistent low-grade-inflammation of intestine [35]. This suggests that alcohol in both acute and chronic settings damages the intestinal barrier and results in increased LPS bioactivity over the period of acute consumption. Afshar et al. have shown an increase in the LPS-induced proinflammatory TNF- α levels 20 min after a single alcohol shot, while after 2 and 5 h an enhanced anti-inflammatory effect due to reduced IL-1 β response upon LPS-stimulation appeared [36]. Similarly, Bala et al. administered single vodka mixed drink to healthy volunteers showing a higher BAC in women compared to men. Few hours after alcohol intake, the serum concentration of endotoxin did not change, whereas sCD14 increased significantly after 24 h being in line with our findings [37]. Interestingly, men who fasted 1 day and subsequently consumed a single drink exhibited a significant decrease of medium BAC value (0.07%). On the other hand, de Jong et al. showed, the intestinal FABP increased in serum right from the start of the experiment but there was no change in sCD14 levels [38]. The different results may be

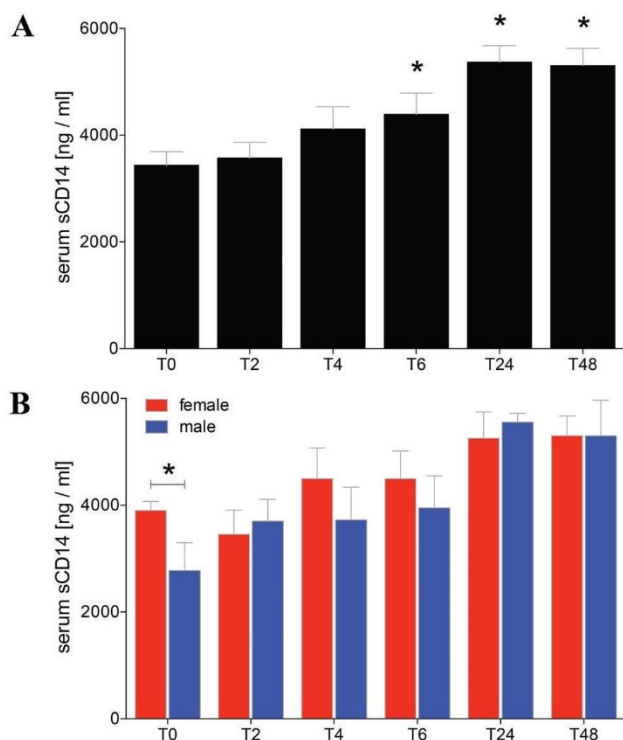


Fig. 5 Soluble (s)CD14 in sera before, during and after alcohol consumption. Mean sCD14 values determined were determined in ng/ml in sera from healthy volunteers before (T0), 2 h (T2), 4 h (T4), 6 h (T6), 24 h (T24) and 48 h (T48) after start of alcohol consumption. **a** Data from all healthy volunteers ($n=22$), and **b** gender-specific results are shown (female: $n=12$ and male: $n=10$). The data are presented as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. T0 or in b vs. indicated groups

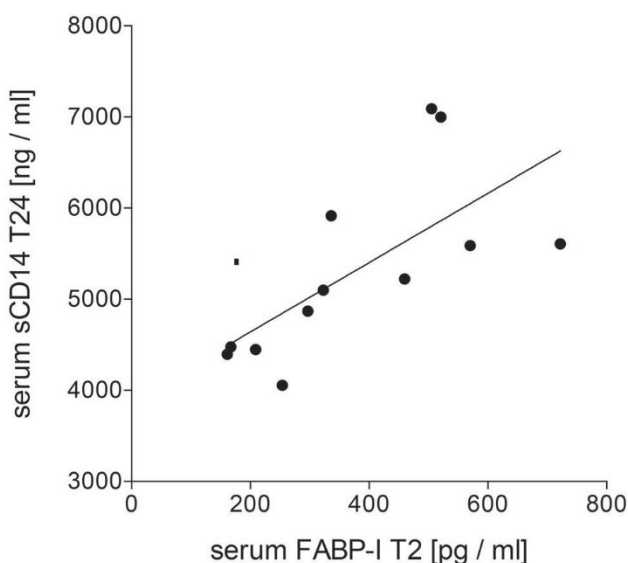


Fig. 6 Spearman analysis of the correlation between the systemic soluble (s)CD14 and intestinal fatty-acid binding protein (FABP-I) after acute alcohol consumption. Positive correlation with a Spearman $r=0.8182$ between the circulatory FABP-I at 2 h (T2) and sCD14 at 24 h after beginning of the alcohol intake is shown ($p < 0.05$, $n=12$)

based on the differences in the study design. Interestingly, we found a significant decrease in intestinal FABP concentration in serum early after acute alcohol consumption. However, the immediate high-fat nutritional intake before alcohol consumption could have contributed to this result since Lubbers et al. demonstrated that a continuous high-protein and high-fat diet exerts anti-inflammatory effects [39]. We demonstrated that alcohol intake increased serum sCD14 significantly at T6 and remained significantly elevated over the next 2 days at T24 and T48.

SolubleCD14 mediates a complex function with binding of LPS and transfer to the TLR4-receptor complex with subsequent proinflammatory immune response [25], but also due to the possibility of neutralizing LPS [27]. Therefore, sCD14 may serve as a biomarker for LPS bioactivity. The significant increase of FABP-I in serum following acute alcohol consumption suggests a possible damage to the intestinal barrier. This might lead to a potential translocation of pathogen-associated molecular pattern and endotoxins. This may be caused by increased BAC with persisting alcohol consumption and thus also a prolonged direct impact of alcohol itself on the intestine wall. In comparison, Lambert et al. detected systemic endotoxins and TNF-alpha in a mouse study after the animals were administered LPS by intragastric gavage after administration of alcohol [40]. However, it should be noted that the immediate origin of measured sCD14 is not clear, so in addition to shedding from leucocytes, synthesis by hepatocytes is possible, and here sCD14 also occurs as an acute phase protein [41]. Under common circumstances multiple drinks during the evening are usual, and, therefore, our study setting constitutes a realistic scenario providing evidence for a disturbed intestinal barrier function upon drinking. The time line of the barrier loss upon drinking and immune-suppressive effects of alcohol on the other hand must be evaluated in further studies.

Strengths and limitations

The investigation of the acute alcohol effects on the intestinal barrier and systemic immune response was conducted in a prospective study of healthy volunteers previously examined clinically and by laboratory chemistry. There was an almost balanced gender distribution with no differences in the blood alcohol concentration between the sexes. However, when considering the individual sexes, the divided cohorts into male and female were not particularly large and not all healthy volunteers appeared for the follow-up measurements at t24 and t48. Furthermore, concomitant effects due to the previous food intake and the use of a mixed drink with cola cannot be excluded. Although our study design is intended to illustrate a realistic scenario with food and several drinks taken over the evening.

Conclusion

We investigated the time-dependent effect of acute alcohol consumption of one per mille on the intestinal barrier in 22 healthy volunteers. 6 h after the onset of alcohol consumption, a significant increase of FABP-I was detectable in serum, suggesting damage to the intestinal barrier after acute alcohol consumption. Furthermore, sCD14 was shown to be significantly elevated at T6, T24 and T48. This suggests an increased LPS bioactivity due to the influence of acute alcohol drinking potentially causing damage of the intestinal barrier, which is still present 2 days after alcohol ingestion. Interestingly, gender-specific effects were observed although the same BAC was present. Females exhibit significantly lower syndecan-1 levels and significantly higher serum sCD14 levels in blood before alcohol intake.

After acute alcohol consumption a potential damage to the intestinal barrier and presumed enhanced systemic endotoxin bioactivity is suggested, which may represent a continuous immunological challenge to the organism and which should be considered for the following days after drinking.

Acknowledgements We thank Katrin Jurida, Kerstin Konradowitz, and Elsie Oppermann for outstanding technical assistance.

Author contributions BR designed the study, obtained the ethical approval, performed statistical analyses and revised the manuscript. RS performed the experiments, the statistical analyses and wrote the original draft. FH, AJ and BX collected the samples and carried out the analyses. JTV and KB revised the manuscript. IRD, CN and IM contributed intellectually to the completion of the study.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant nos. DFG RE 3304/5-1, DFG RE 3304/9-1, DFG NE 1932/1-3 and Nachwuchsförderung AO Trauma Deutschland (R.S.).

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. NIS LeaT-DdS. 2017. Trauma Register DGU Jahresbericht 2017.
2. 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.
3. Green RS, Kureshi N, Erdogan M. Legal consequences for alcohol-impaired drivers injured in motor vehicle collisions: a systematic review. *Accid Anal Prev.* 2015;80:106–16.
4. <Global status report on alcohol and health2018.pdf>.
5. Straßenverkehrsgesetz(StVG) §24a 0 P-G.
6. Organisation WH. 2018. Legal BAC limits by country.
7. Relja B, Menke J, Wagner N, Auner B, Voth M, Nau C, Marzi I. Effects of positive blood alcohol concentration on outcome and systemic interleukin-6 in major trauma patients. *Injury.* 2016;47:640–5.
8. Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. Pathophysiology of multiple trauma: intensive care medicine and timing of treatment. *Chirurg.* 2013;84:753–8.
9. Huber-Lang M, Gebhard F, Schmidt CQ, Palmer A, Denk S, Wiegner R. Complement therapeutic strategies in trauma, hemorrhagic shock and systemic inflammation - closing Pandora's box? *Semin Immunol.* 2016;28:278–84.
10. Wagner N, Akbarpour A, Mors K, Voth M, Stormann P, Auner B, Lehnert M, Marzi I, Relja B. Alcohol intoxication reduces systemic interleukin-6 levels and leukocyte counts after severe TBI compared with not intoxicated TBI patients. *Shock.* 2016;46:261–9.
11. Relja B, Hohn C, Bormann F, Seyboth K, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *Br J Pharmacol.* 2012;165:1188–99.
12. Jurkovich GJ, Rivara FP, Gurney JG, Fligner C, Ries R, Mueller BA, Copass M. The effect of acute alcohol intoxication and chronic alcohol abuse on outcome from trauma. *JAMA.* 1993;270:51–6.
13. Bala S, Tang A, Catalano D, Petrsek J, Taha O, Kodys K, Szabo G. Induction of Bcl-3 by acute binge alcohol results in toll-like receptor 4/LPS tolerance. *J Leukoc Biol.* 2012;92:611–20.
14. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:3–20 (**quiz 1-2**).
15. Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res.* 1996;35:243–82.
16. Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem.* 2003;36:529–35.
17. Voth M, Duchene M, Auner B, Lustenberger T, Relja B, Marzi I. I-FABP is a novel marker for the detection of intestinal injury in severely injured trauma patients. *World J Surg.* 2017;41:3120–7.
18. de Haan JJ, Lubbers T, Derikx JP, Relja B, Henrich D, Greve JW, Marzi I, Buurman WA. Rapid development of intestinal cell damage following severe trauma: a prospective observational cohort study. *Crit Care.* 2009;13:R86.
19. Salim SY, Young PY, Churchill TA, Khadaroo RG. Urine intestinal fatty acid-binding protein predicts acute mesenteric ischemia in patients. *J Surg Res.* 2017;209:258–65.
20. Cronk DR, Houseworth TP, Cuadrado DG, Herbert GS, McNutt PM, Azarow KS. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) for the detection of strangulated mechanical small bowel obstruction. *Curr Surg.* 2006;63:322–5.

21. Sekino M, Funaoka H, Sato S, Okada K, Inoue H, Yano R, Matsumoto S, Ichinomiya T, Higashijima U, Matsumoto S, Hara T. Intestinal fatty acid-binding protein level as a predictor of 28-day mortality and bowel ischemia in patients with septic shock: a preliminary study. *J Crit Care.* 2017;42:92–100.
22. Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1986;103:2683–96.
23. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells.* 2007;24:153–66.
24. Wei S, Gonzalez Rodriguez E, Chang R, Holcomb JB, Kao LS, Wade CE, Group PS. Elevated syndecan-1 after trauma and risk of sepsis: a secondary analysis of patients from the pragmatic, randomized optimal platelet and plasma ratios (PROPPR) trial. *J Am Coll Surg.* 2018;227:587–95.
25. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, Busse LA, Hu MC, Lichtenstein HS, Detmers PA, Wright SD. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Immunol.* 1996;156:4384–90.
26. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1992;176:1665–71.
27. Jacque B, Stephan K, Smirnova I, Kim B, Gilling D, Poltorak A. Mice expressing high levels of soluble CD14 retain LPS in the circulation and are resistant to LPS-induced lethality. *Eur J Immunol.* 2006;36:3007–16.
28. Hacker G, Redecke V, Hacker H. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology.* 2002;105:245–51.
29. Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. Alcohol or gut microbiota: who is the guilty? *Int J Mol Sci.* 2019;20:4568.
30. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP, Initiative S. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol.* 2008;61:344–9.
31. Oldenburger IB, Wolters VM, Kardol-Hoefnagel T, Houwen RHJ, Otten HG. Serum intestinal fatty acid-binding protein in the noninvasive diagnosis of celiac disease. *APMIS.* 2018;126:186–90.
32. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Biochemical markers of acute intestinal ischemia: possibilities and limitations. *Ann Transl Med.* 2018;6:341.
33. Frink M, Pape HC, van Griensven M, Krettek C, Chaudry IH, Hildebrand F. Influence of sex and age on mods and cytokines after multiple injuries. *Shock.* 2007;27:151–6.
34. Hundscheid IHR, Schellekens D, Grootjans J, Derikx JPM, Buurman WA, Dejong CHC, Lenaerts K. Females are more resistant to ischemia-reperfusion-induced intestinal injury than males: a human study. *Ann Surg.* 2018;272(6):1070–9.
35. Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Starkel P, Jamar F, Mikolajczak M, Delzenne NM, de Timary P. Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun.* 2012;26:911–8.
36. Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, Kovacs E, Hasday J. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol.* 2015;49:57–64.
37. Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS ONE.* 2014;9:e96864.
38. de Jong WJ, Cleveringa AM, Greijdanus B, Meyer P, Heineman E, Hulscher JB. The effect of acute alcohol intoxication on gut wall integrity in healthy male volunteers; a randomized controlled trial. *Alcohol.* 2015;49:65–70.
39. Lubbers T, Kox M, de Haan JJ, Greve JW, Pompe JC, Ramackers BP, Pickkers P, Buurman WA. Continuous administration of enteral lipid- and protein-rich nutrition limits inflammation in a human endotoxemia model. *Crit Care Med.* 2013;41:1258–65.
40. Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:880–6.
41. Pan Z, Zhou L, Hetherington CJ, Zhang D-E. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:36430–5.