

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Einfluss von juvenilem Alkoholkonsum auf altersassoziierte Leber- und
Darmschädigung in Mäusen

verfasst von | submitted by

Carolin Schilp B.Sc.

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim
Privatdoz.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung der vorliegenden Masterarbeit. Bereits das erste Modul bei Ihnen hat mich nachhaltig inspiriert. Ihre wissenschaftlichen Impulse, die investierte Zeit sowie die stets professionelle und schnelle Unterstützung bei allen Anliegen haben mir wertvolle, lehrreiche Einblicke ermöglicht.

Dr. Annette Brandt danke ich für ihr stets offenes Ohr, klare Antworten auf jede noch so spezifische Frage, ihre unerschöpfliche Geduld und die vielen Tipps im Labor. Danke für die wertschätzende und herzliche Art.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe: Danke für die tatkräftige Hilfe im Labor, die klugen Ratschläge und die gute, auch amüsante Atmosphäre.

Ebenso danke ich meinen Freund:innen, die ich im Masterstudium kennen lernen durfte. Danke für Zusammenarbeiten, das gegenseitige Unterstützen und Lernen – und vor allem für all die Erlebnisse und Momente, die weit über das Studium hinausgehen.

Ein besonderer Dank geht an meine „Lieblingsmausis“ aus dem Bachelor, die immer noch an meiner Seite sind und die ich niemals missen möchte. Greta danke ich in besonderer Weise: Danke, dass du doch noch in die Arbeitsgruppe gewechselt bist, jede Phase mit mir gemeinsam gegangen bist und immer für mich da warst. Auf viele weitere gemeinsame Jahre!

Mein größtes Dankeschön gilt meiner Familie - vor allem meiner Mama, meinem Papa, meinem Bruder und Ines - dafür, dass ihr immer an mich geglaubt, mich gefördert und in allem unterstützt habt. Meinem Partner Victor danke ich dafür, dass er immer für mich da ist und mich tapfer auf dieser Reise begleitet hat. Ich freu mich auf die nächste Reise mit dir an meiner Seite. Und meiner WG, Antonia und Leon, danke ich für wohltuende Ablenkung, das schöne Nachhausekommen und das herzliche Lachen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Alter und altersassoziierte Veränderungen in Leber und Darm	1
1.1.1 Definition des Begriffs „Altern“ und physiologische Veränderungen im Alter.....	1
1.1.2 Altersassoziierte Veränderungen der Leberfunktion.....	3
1.1.3 Altersassoziierte Veränderungen der Darmbarriere	4
1.2 Alkoholkonsum und Alkoholmetabolismus	5
1.2.1 Konsumverhalten von Jugendlichen und jungen Erwachsenen: Entwicklungen und Trends.....	5
1.2.2 Abbauwege von Ethanol und toxische Zwischenprodukte	7
1.3 Einfluss von Alkohol auf den Alterungsprozess	9
1.3.1 Altersabhängige alkoholbedingte Leberschädigung	9
1.3.2 Altersabhängige alkoholbedingte Darmschädigung	10
1.4 Fragestellung und Zielsetzung.....	12
2. Material- und Reagenzienübersicht	13
2.1 Allgemeine Labormaterialien und Geräte.....	13
2.2 Histologische und immunhistochemische Färbungen	15
2.2.1 Sirius-Red-Färbung von Leber- und Dünndarmgewebe.....	17
2.2.2 Ly6G-Färbung von Lebergewebe.....	17
2.2.3 Cleaved Caspase-3-Färbung von Lebergewebe	18
2.3 Biochemische Analysen.....	18
2.3.1 Triglycerid-Extraktion aus Lebergewebe (FOLCH-Methode) einschließlich Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	18
2.4 Molekularbiologische Methoden	19
2.4.1 RNA-Extraktion aus Dünndarmgewebe	19
2.4.2 cDNA-Synthese	20
2.4.3 PCR-Analysen.....	21
2.5 Eingesetzte Software und Analyseprogramme.....	21
3. Methodik.....	23
3.1 Das Versuchsdesign	23
3.2 Präparation von Leber- und Dünndarmgewebe für histologische und immunhistochemische Färbungen.....	24
3.3 Histologische Färbungen	25

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Lebergewebe	25
3.3.2 Sirius-Red-Färbung von Leber- und Darmgewebe	25
3.4 Immunhistochemische Färbungen	27
3.4.1 Ly6G- und Cleaved Caspase-3-Färbungen von Lebergewebe	27
3.5 Biochemische Analysen	30
3.5.1 Triglycerid-Extraktion aus Lebergewebe (FOLCH-Methode) einschließlich Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	30
3.5.2 Bestimmung der ALT-Konzentration im Pfortaderplasma	31
3.5.3 Bestimmung der TLR2- und TLR4-Liganden-Konzentration im Pfortaderplasma ...	32
3.6 Molekularbiologische Methoden	32
3.6.1 RNA-Extraktion aus Dünndarmgewebe	32
3.6.2 cDNA-Synthese	33
3.6.3 PCR-Analysen	34
3.7 Datenauswertung und Statistik	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Einfluss von juvenilem Alkoholkonsum auf die altersassoziierte Veränderung der Leberhistologie, Parameter der Leberschädigung und Entzündung	37
4.2 Einfluss von juvenilem Alkoholkonsum auf die Darmbarriere	42
5. Diskussion	45
5.1 Das Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen des juvenilen Binge- Drinking auf den Alterungsprozess	45
5.2 Einfluss von juvenilem Binge-Drinking auf die altersassoziierte Leberveränderung im Mausmodell	47
5.3 Einfluss von juvenilem Binge-Drinking auf die altersassoziierte Veränderung der Darmbarriere im Mausmodell	49
6. Fazit und Ausblick	52
Zusammenfassung	53
Summary	54
Literaturverzeichnis	I
Anhang	XII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll der Sirius-Red-Färbung in Leber- und Dünndarmgewebe	26
Tabelle 2: Protokoll der Ly6G- und Cleaved Caspase-3-Färbung	28
Tabelle 3: Herstellung der BSA-Standardreihe für die Proteinbestimmung	31
Tabelle 4: Temperaturprofil der Real-Time qPCR	35
Tabelle 5: Körpergewicht und Leber-/Körpergewichtsratio der C57BL/6J-Mäuse	37
Tabelle 6: Zusammensetzung Tris-EDTA-Puffer	XII
Tabelle 7: Zusammensetzung Mono-Natriumcitrat	XII
Tabelle 8: Zusammensetzung 10x PBS	XII
Tabelle 9: Zusammensetzung TBE-Puffer	XII
Tabelle 10: Zusammensetzung PBST	XIII
Tabelle 11: Verwendete Verdünnungsfaktoren und Extraktionspuffer der Methoden	XIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bevölkerungsprognose Österreichs 2025 & 2060	2
Abbildung 2: Die Kennzeichen des Alterns - "Hallmarks of Aging"	2
Abbildung 3: Altersbedingte Degeneration des Lebergewebes	4
Abbildung 4: Definition von Rauschtrinken (Binge-Drinking) nach NIAAA	6
Abbildung 5: Prozentsatz der alkoholbedingten Todesfälle an den Gesamttodesfällen nach Altersgruppe und WHO-Regionen und der Welt, 2019	7
Abbildung 6: Überblick über den Ethanolabbau in der Leber.....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuchsdesigns	24
Abbildung 8: Temperaturprofil für 18S	35
Abbildung 9: Temperaturprofil für COL1A1	36
Abbildung 10: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Leberhistologie von 24 Monate alten Mäusen	39
Abbildung 11: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf hepatische Lipidakkumulation von 24 Monate alten Mäusen	39
Abbildung 12: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf Entzündungs- und Apoptosemarkern in der Leber von 24 Monate alten Mäusen	40
Abbildung 13: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf fibrotische Veränderungen und Leberschädigungsmarker in der Leber von 24 Monate alten Mäusen.....	41
Abbildung 14: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf Marker der intestinalen Barrierefunktion von 24 Monate alten Mäusen.....	42
Abbildung 15: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Kollagenanreicherung im Dünndarm von 24 Monate alten Mäusen	43
Abbildung 16: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Genexpression von COL1A1 im Dünndarm als Marker fibrotischer Aktivität von 24 Monate alten Mäusen	44

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALD	alkoholbedingte Leberschädigung
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMPs	antimikrobielle Peptide
BMBWF	österreichisches Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
C ₂ H ₆ O	Ethanol
cDNA	komplementäre DNA
CH ₄ O	Methanol
CHCl ₃	Chloroform
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GSH	Glutathion
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSCs	hepatische Sternzellen
iFABP	intestinal fatty acid-binding protein
JAM-A	Junctional Adhesion Molecules A
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LAS X	Leica application suite X
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G
MAMPs	mikrobiell assoziierte molekulare Muster
mL	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
NIAAA	National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	Negativkontrolle
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
qPCR	quantitative PCR
RCF	Relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sCD14	lösliches CD14
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRT1	Sirtuin-1-Protein
SPF	spezifisch pathogenfrei
TCA-Zyklus	Citratzyklus
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WHO	World Health Organization
ZO-1	Zonula Occludens-1
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Alter und altersassoziierte Veränderungen in Leber und Darm

1.1.1 Definition des Begriffs „Altern“ und physiologische Veränderungen im Alter

Altern ist ein fortschreitender biologischer Prozess, der durch die fortlaufende Ansammlung molekularer und zellulärer Schäden zu funktionellem Abbau, höherem Krankheitsrisiko und schließlich zum Tod führt (WHO, 2024a). Ab wann ein Mensch als „alt“ gilt, hängt vom Kontext ab: Während die World Health Organization (WHO) keine feste Altersgrenze definiert, wird in Medizin, Demografie sowie im Rahmen von Ruhestand und Sozialversicherung häufig das 65. Lebensjahr als Beginn des höheren Lebensalters angesetzt (Sabharwal et al., 2015). Laut United Nations Population Division lag der weltweite Anteil der über 65-Jährigen 2024 bei rund 10,3 % (United Nations Population Fund, o.J.). Prognosen zufolge wird dieser Anteil weiter steigen, sodass künftig mehr ältere Menschen als Kinder leben werden (WHO, 2024a). Auch in Österreich ist der demografische Wandel deutlich erkennbar: 2025 waren 20,2 % der Bevölkerung 65 Jahre oder älter (Statista Research Department, 2025), bis 2060 wird ein Anstieg auf etwa 29 % erwartet (STATISTIK AUSTRIA, 2024) (siehe Abbildung 1). Die gesunde Lebenserwartung (Health-Adjusted Life Expectancy) liegt jedoch deutlich unter der durchschnittlichen: Für 2022 wurden bei Geburt 71,5 Jahre für Frauen und 70,3 Jahre für Männer berechnet (GBD 2021 Forecasting Collaborators, 2024), während die Gesamtlebenserwartung 2021 bei 84,1 bzw. 79,2 Jahren lag (GBD 2021 Demographics Collaborators, 2024). Dies bedeutet, dass viele ältere Menschen in Österreich mehrere Jahre mit gesundheitlichen Einschränkungen leben. Zu den häufigsten ernährungsassoziierten Erkrankungen zählen dabei Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen, wie die Österreichische Gesundheitsbefragung 2019 zeigt (STATISTIK AUSTRIA, 2020).

Auf molekularer Ebene ist Altern mit verschiedenen biologischen Prozessen assoziiert, den sogenannten „Hallmarks of Aging“ (siehe Abbildung 2). Dazu zählen Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen, mitochondriale Dysfunktion, DNA-Schäden, verringerte Stammzellregeneration, Verlust der Proteostase, gestörte Nährstoffwahrnehmung, zelluläre Seneszenz, beeinträchtigte Makroautophagie, veränderte Zellkommunikation, Dysbiose und chronische Entzündungen (López-Otín et al., 2023). Dieser chronische, niedriggradige

Entzündungszustand ohne akute Infektion, der altersassoziierte Erkrankungen fördern kann, wird auch als „Inflammaging“ bezeichnet (Franceschi & Campisi, 2014). Diese Veränderungen betreffen auch spezifische Organsysteme wie Leber und Darm, deren physiologische Alterung in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet wird.

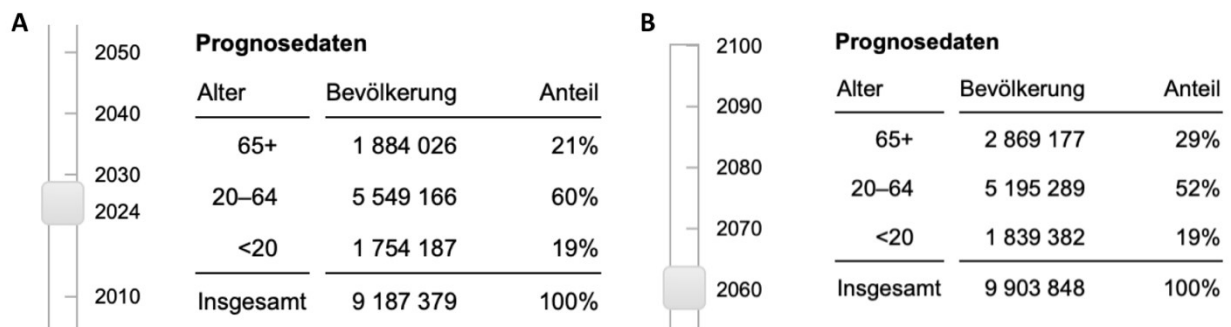


Abbildung 1: Bevölkerungsprognose Österreichs 2025 & 2060

A: Österreichische Bevölkerungsprognose für das Jahr 2025. Der Anteil der ≥ 65 -Jährigen lag 2025 bei 21 %. B: Österreichische Bevölkerungsprognose für das Jahr 2060. Laut Prognosen soll der Anteil der ≥ 65 -Jährigen im Jahr 2060 auf 29 % steigen. Die Abbildung wurde nach (STATISTIK AUSTRIA, 2024) modifiziert.

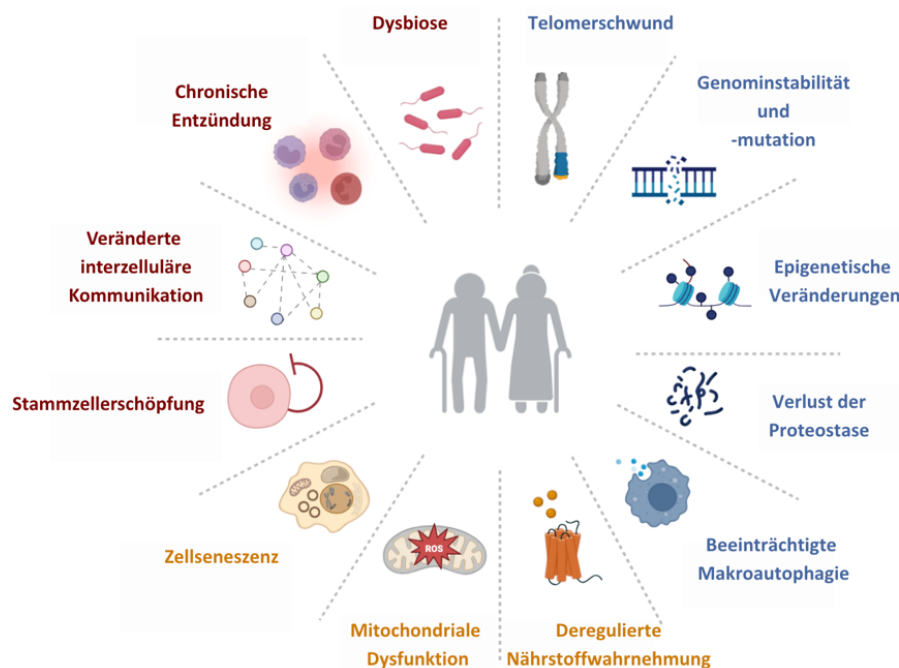


Abbildung 2: Die Kennzeichen des Alterns - "Hallmarks of Aging"

Altern ist gekennzeichnet durch verschiedene biologische Prozesse, darunter Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen, mitochondriale Dysfunktion, DNA-Schäden, verringerte Stammzellregeneration, Verlust der Proteostase, gestörte Nährstoffwahrnehmung, zelluläre Seneszenz, beeinträchtigte Makroautophagie, veränderte Zellkommunikation, Dysbiose und chronische Entzündungen. Die Abbildung wurde nach (López-Otín et al., 2023) modifiziert.

1.1.2 Altersassoziierte Veränderungen der Leberfunktion

Die Leber übernimmt zentrale Stoffwechselfunktionen, darunter die Verstoffwechslung von Nährstoffen, die Regulation des Blutvolumens, die Modulation endokriner Prozesse sowie die Unterstützung der Immunantwort (Yao et al., 2025). Mit zunehmendem Alter lassen sich strukturelle und funktionelle Veränderungen beobachten, die möglicherweise die Organleistung und Krankheitsanfälligkeit beeinflussen (Trefts et al., 2017; Asrani et al., 2019). Dazu zählen unter anderem ein reduziertes Lebervolumen und eine verringerte Durchblutung, Lipofuszin-Akkumulation in Hepatozyten, verminderte Dichte des glatten endoplasmatischen Retikulums sowie eine Abnahme der Gallensäuresekretion und Regenerationsfähigkeit (Schmucker, 2005; Tajiri & Shimizu, 2013).

Tierexperimentelle Studien deuten darauf hin, dass selbst bei altersbedingter „gesunder“ Leberdegeneration inflammatorische Prozesse und fibrotische Veränderungen auftreten können, die unter anderem mit erhöhter Translokation bakterieller Endotoxine infolge einer gestörten Darmbarriere sowie der Aktivierung von Toll-like-Rezeptor-(TLR)-4-abhängigen Signalkaskaden assoziiert sind und zur Aufrechterhaltung des Inflammaging beitragen (Jin et al., 2020) (siehe Abbildung 3). Auch epigenetische Veränderungen, wie etwa veränderte DNA-Methylierungsmuster in differentiell methylierten Regionen, scheinen inflammatorische Signalwege zu beeinflussen (Field et al., 2018). Darüber hinaus wird angenommen, dass altersbedingte Telomerverkürzung genomische Instabilität und Zellzyklusarrest begünstigen könnte (Penrice et al., 2024), während seneszente Hepatozyten durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine die regenerative Kapazität weiter einschränken (Watanabe et al., 2017). Erhöhte Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies könnten oxidativen Stress, DNA-Schäden und mitochondriale Dysfunktion fördern (Szeto, 2006). Studien weisen auch daraufhin, dass eine Überaktivierung des Hedgehog-Signalwegs zusätzlich zur Hemmung von Zellproliferation und Regeneration beiträgt (Yao et al., 2025).

Insgesamt wird diskutiert, dass neben den natürlichen degenerativen Veränderungen diese molekularen Anpassungen das Risiko für chronische Lebererkrankungen und erhöhte

Mortalität im Alter steigern könnte (Fontana et al., 2013). Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen könnte daher eine Grundlage für präventive und therapeutische Strategien zum Erhalt der Leberfunktion im höheren Lebensalter bieten.

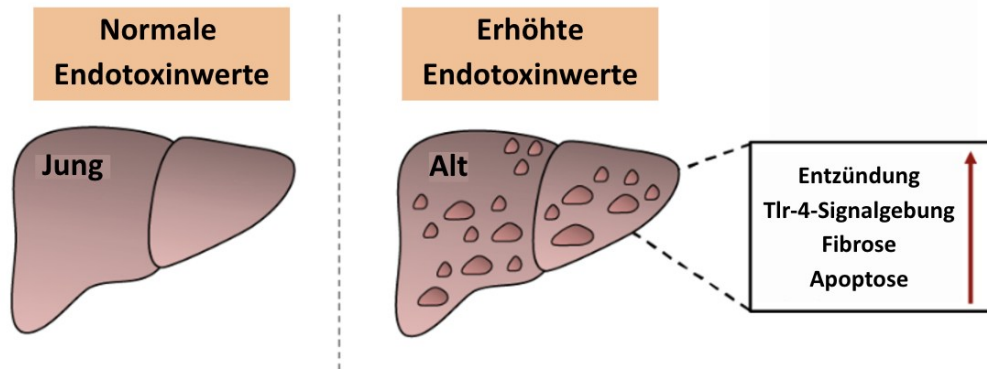


Abbildung 3: Altersbedingte Degeneration des Lebergewebes

Während bei jungen Tieren mit „gesunder“ Leberstruktur normale Endotoxinwerte vorliegen, zeigen ältere Tiere erhöhte Endotoxinwerte, die mit Entzündung, Aktivierung der Toll-like-Rezeptor(TLR)-4-Signalgebung, Fibrose und Apoptose assoziiert sind. Diese Prozesse tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung des Inflammaging bei. Die Abbildung wurde nach (Jin et al., 2020) modifiziert.

1.1.3 Altersassoziierte Veränderungen der Darmbarriere

Die intestinale Barriere trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei, indem sie vor pathogenen Mikroorganismen, Toxinen und anderen potenziell schädlichen Substanzen schützt, während sie gleichzeitig die selektive Aufnahme von Nährstoffen, Wasser und Elektrolyten ermöglicht (Turner et al., 2009). Sie besteht aus einer schützenden Mukusschicht, dem intestinalen Epithel mit interzellulären Tight Junctions sowie immunologischen Komponenten wie Becherzellen, Paneth-Zellen, intraepithelialen Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (Shemtov et al., 2022; Untersmayr et al., 2022).

Obwohl die Gesamtarchitektur des Epithels auch im Alter weitgehend erhalten bleibt (Brandt et al., 2022), deuten verschiedene Befunde auf funktionelle Veränderungen hin. So wurde berichtet, dass die Expression von Tight-Junction-Proteinen wie ZO-1, Occludin und JAM-A mit zunehmendem Alter abnimmt, während die permeabilitätsfördernde Expression von Claudin-2 sowie die Hochregulation von microRNA-29a zunehmen können (Tran & Greenwood-Van Meerveld, 2013; Ye et al., 2011). Auch eine Störung der Stickstoffmonoxid-(NO)-Homöostase wurde beschrieben, die in Kombination mit dem Verlust von Tight-Junction-Proteinen die

Barriere zusätzlich beeinträchtigen könnte (Brandt et al., 2022). Diese Veränderungen führen zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität, wodurch mikrobielle Bestandteile, insbesondere Lipopolysaccharide (LPS), aus dem Darmlumen in die Zirkulation gelangen (Jin et al., 2020; Untersmayr et al., 2022). Dieses Phänomen wird als „metabolische Endotoxämie“ bezeichnet (Ghosh et al., 2020). In diesem Zusammenhang wurden auch erhöhte Konzentrationen von LPS-bindendem Protein (LBP) und löslichem CD14 (sCD14) im Serum beschrieben, die eine endotoxinvermittelte Immunaktivierung anzeigen können (Walker et al., 2019). Darüber hinaus wird ein Zusammenhang zwischen der altersbedingten Dysbiose der Darmmikrobiota und der gestörten Barrierefunktion im Kolon diskutiert (Nagpal et al., 2018). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass selbst bei einer Transplantation der Mikrobiota von juvenilen Mäusen in alte Mäuse die Barrierefunktionsstörung bestehen bleibt, was auf intrinsische, altersabhängige Veränderungen im Darmepithel hinweisen könnte (Brandt et al., 2022). Zusammenfassend deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass die Darmbarriere mit zunehmendem Alter geschwächt sein könnte. Diese Veränderungen werden mit einer erhöhten Anfälligkeit für gastrointestinale Erkrankungen in Verbindung gebracht und könnten zur systemischen Inflammationslast im Alter beitragen.

1.2 Alkoholkonsum und Alkoholmetabolismus

1.2.1 Konsumverhalten von Jugendlichen und jungen Erwachsenen: Entwicklungen und Trends

Alkohol ist das am häufigsten konsumierte Suchtmittel unter Jugendlichen und jungen Erwachsenen. Weltweit gaben 27 % der Jugendlichen für das Jahr 2018 an, im letzten Monat Alkohol konsumiert zu haben (WHO, 2018). Spätere regionale Daten legen nahe, dass diese Zahl in Europa 2022 bei etwa 37 % lag (WHO/Europe, 2024). Alkohol ist die einzige psychoaktive Substanz mit erheblichem Einfluss auf die globale Gesundheit, die international nicht durch rechtlich bindende Regulierungsinstrumente erfasst ist (WHO, 2024b). Ein Konsum in jungen Jahren erhöht zudem das Risiko, später eine Abhängigkeit zu entwickeln (Ventura-Cots et al., 2017).

Die Adoleszenz, die Entwicklungsphase zwischen Kindheit und Erwachsenenalter, geprägt von Wachstum, pubertärer Reifung und neurobiologischen Veränderungen, geht mit erhöhter Anfälligkeit für exogene Einflüsse wie Alkohol einher (Windle et al., 2008). Häufig treten in

dieser Lebensphase riskante Konsummuster auf, darunter Rauschtrinken (Binge-Drinking), definiert vom National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) als Trinkmuster, bei dem die Blutalkoholkonzentration innerhalb von etwa zwei Stunden auf mindestens 0,08 g/dl steigt. Dies entspricht bei Erwachsenen mindestens fünf Standardgetränken für Männer bzw. vier für Frauen (siehe Abbildung 4). Jugendliche erreichen diesen Wert oft schon aufgrund geringerer Körpermasse und geringerer Stoffwechselkapazität bereits nach drei bis fünf Drinks (NIAAA, 2025).

Studien weisen darauf hin, dass junge Menschen überproportional von alkoholbedingten Folgen betroffen sind. So waren im Jahr 2019 13 % aller Todesfälle der 20- bis 30-Jährigen alkoholbedingt (siehe Abbildung 5). In den USA berichteten 2023 rund 28,7 % der 18- bis 25-Jährigen von Rauschtrinken im letzten Monat; bei Vollzeitstudierenden waren es 27,9 % (WHO, 2024b). In Österreich konsumieren 53 % der 15-Jährigen Alkohol, deutlich über dem HBSC-Durchschnitt von 37 %, der aus der internationalen WHO-Studie (HBSC) stammt. Der Alkoholkonsum steigt mit zunehmendem Alter, variiert nach sozioökonomischem Hintergrund, und Jungen berichten häufiger regelmäßigen Konsum als Mädchen (Felder-Puig et al., 2024).

Diese Daten verdeutlichen, dass riskante Trinkmuster, insbesondere Binge-Drinking, trotz teils rückläufiger Trends weiterhin eine erhebliche Herausforderung für die öffentliche Gesundheit darstellen. Die Auswirkungen wiederholter Ethanolexposition im Jugendalter auf Leber- und Darmfunktionen im Hinblick auf die altersassoziierten Veränderungen im Erwachsenenalter sind bislang jedoch kaum untersucht.



Abbildung 4: Definition von Rauschtrinken (Binge-Drinking) nach NIAAA

Beschrieben wird ein Trinkmuster, bei dem die Blutalkoholkonzentration innerhalb von etwa zwei Stunden auf $\geq 0,08$ g/dl steigt, was bei Frauen dem Konsum von mindestens vier und bei Männern von mindestens fünf Standardgetränken entspricht. Die Abbildung wurde nach (NIAAA, 2025) modifiziert.

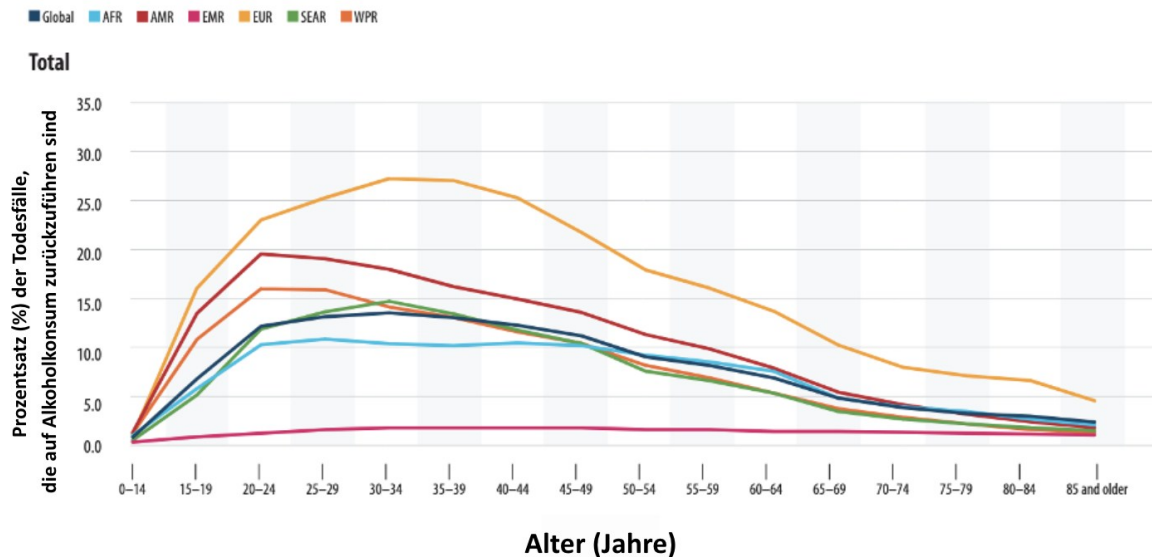


Abbildung 5: Prozentsatz der alkoholbedingten Todesfälle an den Gesamttodesfällen nach Altersgruppe und WHO-Regionen und der Welt, 2019

Weltweit war Alkohol im Jahr 2019 für 6,7 % aller vorzeitigen Todesfälle verantwortlich. Jüngere Menschen waren im Vergleich zu älteren Menschen überproportional von Alkohol betroffen, wobei der Anteil der alkoholbedingten Todesfälle an allen Todesfällen bei Personen im Alter von 20 bis 39 Jahren am höchsten war; 13,0 % aller Todesfälle unter diesen Personen waren auf Alkoholkonsum zurückzuführen. Global = Weltweit, AFR = Afrika, AMR = Amerika, EMR = Östliches Mittelmeer, EUR = Europa, SEAR = Südostasien, WPR = Westpazifik. Die Abbildung wurde nach (WHO, 2024b) modifiziert und übersetzt. Diese Übersetzung wurde nicht von der WHO erstellt. Die WHO ist nicht für den Inhalt oder die Richtigkeit dieser Übersetzung verantwortlich. Die englische Originalausgabe ist verbindlich und authentisch. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

1.2.2 Abbauwege von Ethanol und toxische Zwischenprodukte

Die gesundheitsschädlichen Wirkungen des Alkoholkonsums beruhen in erster Linie auf dem Ethanolgehalt. Ethanol (EtOH) entfaltet seine Effekte über drei Hauptwege: Durch direkte toxische Wirkungen auf Organe und Gewebe, durch seine psychoaktiven Eigenschaften, die zu Rauschzuständen mit Beeinträchtigungen von Kognition, Motorik und Verhalten führen, sowie durch die Entwicklung einer Abhängigkeit, die schädliche Konsummuster begünstigt (WHO, 2007; Rehm et al., 2017). Weitere Bestandteile alkoholischer Getränke wie

Acetaldehyd, Methanol, Ethylcarbamat oder Schwermetalle tragen zusätzlich zur Toxizität bei (Pál et al., 2020).

Nach oraler Aufnahme wird EtOH überwiegend im Dünndarm durch passive Diffusion aufgenommen und gelangt über die Pfortader in die Leber (Levine et al., 2020). Ein kleiner Anteil wird bereits im Magen von Schleimhautenzymen wie der Alkoholdehydrogenase (ADH) metabolisiert (First-Pass-Effekt). Der Hauptabbau von EtOH erfolgt in den Hepatozyten: Ethanol wird primär im Zytosol durch ADH zu Acetaldehyd oxidiert (Baraona et al., 2001; Osna et al., 2022) und bei hohen Konzentrationen zusätzlich über das mikrosomale Ethanol-oxidierende System (CYP2E1) abgebaut (Jiang et al., 2020) (siehe Abbildung 6). Das entstandene Acetaldehyd wird anschließend in den Mitochondrien durch Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat umgewandelt, das über Acetyl-CoA in den Energiestoffwechsel eingeschleust wird (Levine et al., 2020). Die Ethanoloxidation verschiebt das Redoxverhältnis zugunsten von NADH (Levine et al., 2020), hemmt Glukoneogenese, Glykolyse und Citratzyklus und steigert die Fettsäuresynthese, die ein wesentlicher Mechanismus der alkoholbedingten Fettleber ist (Osna et al., 2022; Zakhari & Li, 2007). CYP2E1 trägt bei chronischem Konsum zusätzlich zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei (Ekström & Ingelman-Sundberg, 1989; Wang et al., 2009), reduziert die antioxidative Kapazität durch Glutathionmangel (Wu & Cederbaum, 1999; Wang et al., 2009) und aktiviert potenziell Prokarzinogene, wodurch Leberschäden und Karzinogenese gefördert werden (Wu & Cederbaum, 1999; Guengerich et al., 1991). Der Darm spielt ebenfalls eine Rolle: Chronischer Alkoholkonsum kann zur Dysbiose führen, die Darmpermeabilität erhöhen und die Translokation bakterieller Toxine wie LPS in den Pfortaderkreislauf begünstigen (Chung et al., 2025; Jin et al. 2020). In der Leber erkennen Kupffer-Zellen diese über Toll-like-Rezeptoren, aktivieren NF- κ B und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , verstärken ROS-Bildung (Jung et al., 2023) und tragen zur Entstehung alkoholbedingter Lebererkrankungen bei (Albano, 2008). Die Kombination aus direkter chemischer Toxizität, Redoxverschiebung, Fettakkumulation und immunologischer Entzündungsreaktion macht Ethanol besonders schädlich für Leber und Darm.

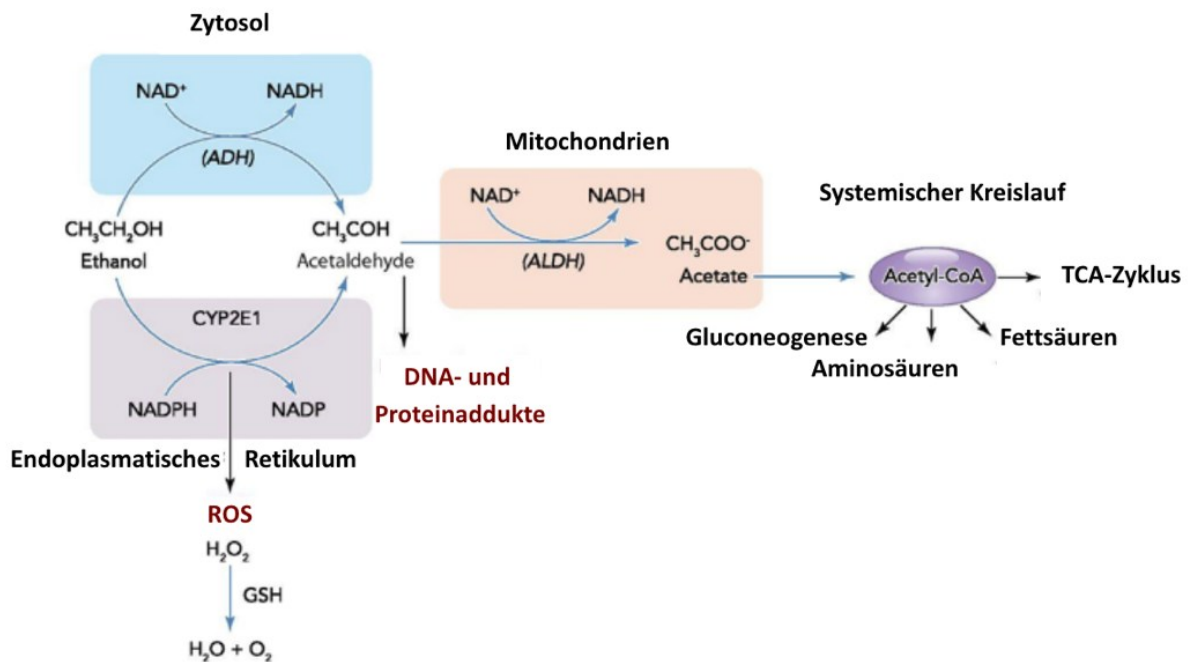


Abbildung 6: Überblick über den Ethanolabbau in der Leber

Ethanol wird im Zytosol primär durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert, welches in den Mitochondrien durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) weiter zu Acetat metabolisiert wird. Acetat wird zu Acetyl-CoA umgewandelt und kann in den Citratzyklus (TCA-Zyklus) eingeschleust oder für die Synthese von Fettsäuren, Aminosäuren und Glucose genutzt werden. Zusätzlich katalysiert das Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) im endoplasmatischen Retikulum ebenfalls die Umwandlung von Ethanol, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die durch Glutathion (GSH) entgiftet werden können. Akkumulierendes Acetaldehyd sowie ROS begünstigen die Bildung von DNA- und Proteinaddukten, was zur hepatotoxischen Wirkung von Alkohol beiträgt. Die Abbildung wurde nach (Molina et al., 2014) modifiziert.

1.3 Einfluss von Alkohol auf den Alterungsprozess

1.3.1 Altersabhängige alkoholbedingte Leberschädigung

Als zentrales Organ im Ethanolstoffwechsel scheint die Leber besonders anfällig für alkoholinduzierte Schädigungen und toxische Zwischenprodukte zu sein (Osna & Kharbanda, 2016). Hinweise aus tierexperimentellen Arbeiten deuten darauf hin, dass diese Empfindlichkeit im höheren Alter zunehmen könnte. In verschiedenen Tiermodellen wurde beobachtet, dass ältere Mäuse und Ratten nach Alkoholexposition teils ausgeprägtere Leberschäden, verstärkte Entzündungsreaktionen und eine stärkere Fibroseentwicklung zeigen als jüngere Tiere (Bellamkonda et al., 2025; Ramirez et al., 2017). Als mögliche Ursachen werden eine erhöhte Bildung von ROS und ein daraus resultierendes Redox-

Ungleichgewicht diskutiert, das mit oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion, Stress des endoplasmatischen Retikulums sowie einer Beeinträchtigung überlebensfördernder Signalwege in Hepatozyten verbunden sein könnte (Ramirez et al., 2017; Idelfonso-García et al., 2024). Diese Prozesse scheinen zur Aktivierung von Phagozyten und adaptiven Immunreaktionen beizutragen und könnten über die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSCs) die Freisetzung profibrotischer Zytokine fördern, was eine beschleunigte Fibroseentwicklung begünstigen würde (Albano, 2008; Michalak et al., 2021). Auch Veränderungen in der Expression regulatorischer Proteine könnten eine Rolle spielen. So weisen einige tierexperimentelle Studien darauf hin, dass die altersabhängige Herunterregulierung des Sirtuin-1-Proteins (SIRT1) in Hepatozyten und HSCs nach Alkoholbelastung stärker ausgeprägt ist als bei jüngeren Tieren (Ramirez et al., 2017). Da SIRT1 normalerweise protektiv wirkt, indem es inflammatorische und fibrotische Signalwege hemmt, könnte dessen Abnahme zu einer verstärkten Progression alkoholbedingter Leberschädigungen beitragen (Ren et al., 2020).

Zusammenfassend deuten tierexperimentelle Befunde darauf hin, dass Alterungsprozesse die Schwere und Progression alkoholbedingter Leberschädigungen (ALD) verstärken könnten. Offene Fragen bestehen jedoch insbesondere hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen sowie darüber, ob Alkoholkonsum im jungen Erwachsenenalter ähnliche pathophysiologische Kaskaden anstößt, die sich erst später manifestieren.

1.3.2 Altersabhängige alkoholbedingte Darmschädigung

Im Rahmen des Alterungsprozess könnte Alkoholkonsum eine zusätzliche Belastung für die Darmbarriere darstellen, was wiederum indirekte Auswirkungen auf die Leber haben könnte. Tierexperimentelle Daten deuten darauf hin, dass ältere Mäuse im Gegensatz zu jüngeren nach moderater Ethanolexposition (1,25-1,5 g/kg Körpergewicht (KG) an drei aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche über vier Wochen) eine erhöhte Darmpermeabilität aufweisen. Hinweise darauf ergeben sich aus Befunden einer gesteigerten bakteriellen Translokation, erhöhten Serumspiegeln des intestinal fatty acid-binding protein (iFABP) sowie einem vermehrten Austritt von FITC-Dextran aus dem Darm (McMahan et al., 2021).

Zusätzlich legen experimentelle Arbeiten aus In-vitro-Modellen (Caco-2-Zellen) nahe, dass Ethanol und seine Metaboliten die Expression von Tight-Junction-Proteinen beeinflussen können (Rao, 2008). Ähnliche Effekte wurden in Tierstudien an Mäusen und Ratten

beobachtet, wobei sowohl die mechanischen Komponenten der Barrierschicht (Tight Junctions) als auch antimikrobielle Peptide (AMPs) betroffen sein könnten (Wang et al., 2016; Yan et al., 2011). Diskutiert wird, dass solche Veränderungen das Eindringen von mikrobiell assoziierten molekularen Mustern (MAMPs) in mesenteriale Lymphknoten und die Leber erleichtern könnten, was wiederum zu entzündlichen Reaktionen führt (Yan et al., 2011; Hartmann et al., 2015). Auch in einem Rattenmodell mit chronischer Ethanolfütterung (ca. 20 % Ethanol in der Trinklösung über mehrere Wochen) wurden bei älteren Tieren eine reduzierte Expression von Tight-Junction-Proteinen im Ileum und erhöhte Serum-Endotoxinspiegel beschrieben (Bellamkonda et al., 2025). Diese Endotoxinbelastung könnte über die Darm-Leber-Achse potenziell Entzündungen und womöglich fibrotische Veränderungen in der Leber fördern (Szabo & Bala, 2010). Da solche Effekte bisher überwiegend in älteren Tieren beobachtet wurden, lässt sich ableiten, dass Alterungsprozesse die Empfindlichkeit des Darms gegenüber Ethanol erhöhen könnten.

Diese Befunde verdeutlichen die potentielle synergistische Wirkung von Alkoholkonsum und Alterungsprozessen. Während bei älteren Organismen der Konsum von Alkohol die strukturelle und funktionelle Belastung dieser Organe durch den Alterungsprozess deutlich verstärkt, bleibt bislang weitgehend unerforscht, ob Alkoholexposition im jungen Erwachsenenalter bei späterer Abstinenz ähnliche Veränderungen einleitet. Diese Frage wird in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ein hoher Alkoholkonsum im Jugend- und jungen Erwachsenenalter stellt weltweit ein relevantes gesundheitliches Problem dar, da er mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für akute Schädigungen wie Intoxikationen und Unfällen sowie für die Entwicklung chronischer Erkrankungen assoziiert ist (WHO, 2024; NIAAA, 2025). Während die unmittelbaren Auswirkungen von Alkohol auf Organe wie die Leber durch klinische Beobachtungen und tierexperimentelle Studien bereits gut beschrieben sind, ist bislang unzureichend geklärt, ob und in welchem Ausmaß ein früher Alkoholkonsum auch langfristige Folgen auf zentrale Organsysteme wie Leber und Darm hat. Besonders wenig erforscht ist, inwiefern Alkoholexposition in einer frühen Lebensphase den Verlauf altersassoziierter struktureller und funktioneller Veränderungen dieser Organe beeinflussen könnte.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Masterarbeit, zu untersuchen, wie sich juveniler Alkoholkonsum mit späterer Abstinenz auf den natürlichen Alterungsprozess von Leber und Darm auswirkt und welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung sollen insbesondere folgende Punkte adressiert werden:

1. Beeinflusst Alkoholkonsum im jungen Erwachsenenalter die altersassozierte Gewebeschädigung und Entzündung in der Leber?
2. Hat juveniler Alkoholkonsum Auswirkungen auf die altersassozierten Veränderungen der intestinalen Barrierefunktion?

2. Material- und Reagenzienübersicht

2.1 Allgemeine Labormaterialien und Geräte

Material/Gerät	Hersteller
96-Well-Platten	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Aluminiumblock	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Aluminiumfolie Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bioer Mixing Block MB-102	Bioer Technology Co., Ltd., Zhejiang, China
Destilliertes Wasser (dH ₂ O)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Eppendorf Research® Kolbenhubpipetten (2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, Vereinigte Staaten
Flüssigstickstoff	Air Liquide Austria GmbH, Schwechat, Österreich
Flüssigstickstoffbehälter	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schwieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heidolph REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland
KIMTECH™ Science, Labortücher – weiß	Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Koblenz/Rheinhafen, Deutschland
Laborhandschuhe Größe M	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland

Magnetrührer – PCE-MSR 100	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Magnetstäbchen Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mehrkanalpipette (100 µL, 200 µL, 300 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Messzylinder (100 mL, 1 L)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Microplate Reader SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, San Jose, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Permanent Marker – alkoholbeständig	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter 420 A	Orion Research Inc., Jacksonville, USA
Pinzetten	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Pipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 100 µL, 300 µL, 1000 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Plastik-Wiegeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pufferwanne Kunststoff	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Reagenzglasschüttler RS-VA10	PHOENIX Instrument GmbH, Garbsen. Deutschland
Reagiergefäßständer Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße (0,5 mL, 1,5mL, 2mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Schere	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Schraubröhren mit Spitzboden (15 mL, 50 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Schutzbrille	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Styroporboxen	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
TipOne Filterspitzen	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Wiegebesteck	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wiegeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge HERMLE Z 216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.2 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Material/Gerät	Hersteller
Behälter (für Lösungen wie C ₂ H ₆ O, Roti-Histol etc.)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Deckglas	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Digital Orbital Shaker	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Vereinigte Staaten

Färbekassette	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Färbepipette	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Fettstift (A-PAP Pen)	Sigma Aldrich Chemistry GmbH, Steinheim, Deutschland
Glasküvette	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Glasstab	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Kühlschrank	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Mikroskop (200-fache Vergrößerung)	Leica, DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Objektträger Superfrost® plus	Labxperts GmbH, Klosterneuburg, Österreich
Reagenz/Lösung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAKO Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	Agilent Technologies, Santa Clara, Vereinigte Staaten
DAKO REAL Peroxidase-Blockierungslösung	Agilent Technologies, Santa Clara, Vereinigte Staaten
dH ₂ O	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Entellan	Sigma Aldrich Chemistry GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol 30 %, 70 %, 95 %, 100 % (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Hämatoxylin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leitungswasser	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
PBA: 1 % BSA in PBST	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS: Natriumchlorid (NaCl) Kaliumchlorid (KCl) Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.2.1 Sirius-Red-Färbung von Leber- und Dünndarmgewebe

Reagenz/Lösung	Hersteller
Fast Green (0,1 % Fast Green in 1 %iger Essigsäure)	Sigma Aldrich Chemistry GmbH, Steinheim, Deutschland
Sirius Red (0,1 %iger Sirius Red Lösung in Pikrinsäure)	Sigma Aldrich Chemistry GmbH, Steinheim, Deutschland
Angesäuertes Wasser (5 mL Essigsäure in 1 L dH ₂ O)	Sigma Aldrich Chemistry GmbH, Steinheim, Deutschland

2.2.2 Ly6G-Färbung von Lebergewebe

Reagenz/Lösung	Hersteller
Anti Rabbit HRP Polymer (sekundärer Antikörper)	Cell IDx, San Diego, USA

Ly6G Primärantikörper	Abcam Limited, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich

2.2.3 Cleaved Caspase-3-Färbung von Lebergewebe

Reagenz/Lösung	Hersteller
Anti Rabbit HRP Polymer (sekundärer Antikörper)	Cell IDx, San Diego
Cleaved Caspase-3 Primärantikörper	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Mono-Natriumcitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Biochemische Analysen

2.3.1 Triglycerid-Extraktion aus Lebergewebe (FOLCH-Methode) einschließlich Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Material/Gerät	Hersteller
Becherglas DURAN®	DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
CLARIOstar ^{PLUS}	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Concentrator Plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
iMark™ Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
MiniBatch D-9 Homogenisier & Dispergierer	MICCRA GmbH, Buggingen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator SONOPULS HD 2070	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Zirkonoxidperlen	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland

Reagenz/Lösung	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform $\geq 99,9\%$ (CHCl_3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
dH ₂ O	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Leitungswasser	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Methanol $\geq 99,9\%$ (CH_4O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIGS – Triglycerid Kit	Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Irland

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion aus Dünndarmgewebe

Material/Gerät	Hersteller
Chemidoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
EasyPhor Midi96 Gelelektrophorese Kammer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Parafilm® M	Amtcor, Zürich, Schweiz
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Precellys 24touch	Bertin Technologie SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Zirkonoxidperlen	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland

Reagenz/Lösung	Hersteller
Agarose	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
CHCl ₃ ≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Dye NonTox	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
C ₂ H ₆ O 75 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Borat-EDTA-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	TRIidty G™, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasser – BioScience Grade, DEPC-behandelt, steril, Nuklease-frei, autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.4.2 cDNA-Synthese

Material/Gerät	Hersteller
DLAB D1008 Palm Micro Centrifuge	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Multiply®-μStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Thermocycler LifeECO	Bioer Technology Co., Ltd., Zhejiang, China
UV-STAR® Microplatten	Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Reagenz/Lösung	Hersteller
Reverse Transcription System	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 DNase Stop Solution	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Corporation, Madison, USA

RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
Wasser – BioScience Grade, DEPC-behandelt, steril, Nuklease-frei, autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.4.3 PCR-Analysen

Material/Gerät	Hersteller
CFX Connect™ Real-Time system	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
DLAB D1008 Palm Micro Centrifuge	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Hard-Shell PCR Plates 96-well, thin wall	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Microseal® 'B' seal Seals	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Zentrifuge Z 446 K	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

Reagenz/Lösung	Hersteller
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Primer forward (18S, COL1A1)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer reverse (18S, COL1A1)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Wasser – BioScience Grade, DEPC-behandelt, steril, Nuklease-frei, autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Eingesetzte Software und Analyseprogramme

Software	Hersteller
BioRender.com	BioRender, Toronto, Kanada
Canva.com	Canva, Perth, Australien

CFX Manager™ Software Version 3.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, Vereinigte Staaten
Leica application suite 4.5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica application suite X (LAS X)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten

3. Methodik

3.1 Das Versuchsdesign

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen aus tierexperimentellen Versuchen, die bereits vor Beginn der Masterarbeit von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bergheim durchgeführt wurden. Die Experimente wurden vom österreichischen Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) genehmigt (2021-0.464.120). Die Haltung der Tiere erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in den Tierräumlichkeiten der Universität Wien. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen (12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus, Raumtemperatur 23–24 °C, relative Luftfeuchtigkeit ca. 55 %) gehalten und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Insgesamt wurden Gewebeproben von 35 männlichen C57BL/6J-Mäusen (Eigenzucht) verwendet (siehe Abbildung 7). Neun dieser Tiere erhielten ab einem Alter von drei Monaten über einen Zeitraum von vier Wochen zweimal pro Woche zusätzlich zum Standardfutter eine orale Gabe von Ethanol in einer Dosierung von 6 g/kg KG. Die Kontrollgruppe (n = 9) erhielt in diesem Zeitraum eine isokalorische Menge an Maltodextrin (42 kcal/kg KG) per Schlusssonde. Nach der einmonatigen Alkohol- bzw. Maltodextrinexposition wurden alle Tiere unter Standardbedingungen weitergehalten und bis zu einem Alter von 24 Monaten gealtert. Zur Unterscheidung alkoholinduzierter Effekte von altersbedingten Veränderungen wurden zusätzlich Gewebeproben von vier Monate alten, unbehandelten (naiven) C57BL/6J-Mäusen herangezogen (n = 8). Am Versuchsende wurden die Mäuse mit Ketamin (Ketamidor®, 100 mg/kg KG) und Xylazin (Nerfasin® vet, 16 mg/kg KG) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss erfolgte die Blutentnahme aus der Pfortader und Leber sowie Dünndarm wurden entnommen. Die Gewebe wurden entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert oder in 4 % mit PBS-gepufferter Formaldehydlösung fixiert, um sie für weitere histologische und molekularbiologische Analysen vorzubereiten.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuchsdesigns

Dargestellt sind die Gruppeneinteilung der C57BL/6J-Mäuse, die Behandlungsphase mit Ethanol bzw. isokalorischem Maltodextrin, die anschließende Alterung bis 4/24 Monate sowie die Zeitpunkte der Gewebe- und Blutentnahme. Die Abbildung wurde mit Canva.com erstellt.

3.2 Präparation von Leber- und Dünndarmgewebe für histologische und immunhistochemische Färbungen

Die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte durch eine Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Bergheim, die bereits zuvor die Paraffineinbettung der Leber- und Dünndarmproben durchgeführt hatte. Aus den eingebetteten Geweben wurden mithilfe eines Mikrotoms feine Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Nach dem Auftragen auf Objektträger erfolgte eine Trocknung der Schnitte über drei Tage bei 37 °C. Die so vorbereiteten Präparate wurden anschließend entweder histologisch untersucht oder im Rahmen immunhistochemischer Färbungen mit spezifischen Antikörpern analysiert. Alle Schritte zur Entparaffinierung, Rehydrierung, Dehydrierung und Differenzierung erfolgten auf dem Schüttler (Orbital Shaker) bei 80-100 rpm.

3.3 Histologische Färbungen

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Lebergewebe

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung wurde an den paraffineingebetteten Leberschnitten von Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Bergheim durchgeführt. Ziel dieser routinemäßigen Färbung war die Beurteilung der Gewebemorphologie sowie potenzieller pathologischer Veränderungen, wie Zellschädigungen, Infiltrationen oder strukturelle Umbauprozesse. Die HE-Färbung stellt Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma sowie extrazelluläre Matrixanteile rosa dar, wodurch eine differenzierte histologische Beurteilung des Lebergewebes ermöglicht wird (Feldman & Wolfe, 2014).

3.3.2 Sirius-Red-Färbung von Leber- und Darmgewebe

Zur Darstellung von fibrillärem Kollagen im Lebergewebe wurden die Gewebeproben nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Sirius Red gefärbt und durch eine zusätzliche Gegenfärbung mit Fast Green differenziert. Sirius Red ist ein stark anionischer Farbstoff, der spezifisch an kollagene Fasern bindet und dadurch eine zuverlässige Visualisierung und Quantifizierung von fibrotischen Veränderungen im Gewebe ermöglicht (Bhutda et al., 2017). Die Gegenfärbung mit Fast Green hebt nicht-kollagene Strukturen kontrastreich hervor und erleichtert so die Abgrenzung der kollagenhaltigen Areale (Segnani et al., 2015). Die Sirius-Red-Färbung des Dünndarmgewebes erfolgte in Anlehnung an die bereits beschriebene Methode für Lebergewebe. Dabei wurden die Schnitte analog entfärbt, rehydratisiert und gefärbt. Abweichend zur Leberfärbung betrug die Färbedauer mit Sirius Red 60 Minuten. Anschließend wurde das überschüssige Färbemittel zweimal für je 2 Minuten mit angesäuertem Wasser entfernt, gefolgt von einem kurzen Spülgang mit leicht fließendem destilliertem Wasser. Auf die Gegenfärbung mit Fast Green, die zur besseren Kontrastierung im Lebergewebe verwendet wurde, wurde bei der Dünndarmfärbung vollständig verzichtet. Die einzelnen Schritte des Färbeprotokolls sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Protokoll der Sirius-Red-Färbung in Leber- und Dünndarmgewebe

Verfahrensschritt	Lebergewebe	Dünndarmgewebe
Entparaffinierung	20 Minuten Roti-Histol	20 Minuten Roti-Histol
Rehydrierung	Je 2 Minuten: 100 %, 95 %, 70 %, 30 % EtOH	Je 2 Minuten: 100 %, 95 %, 70 %, 30 % EtOH
Spülung	Kurz in dH ₂ O	Kurz in dH ₂ O
Färbung mit Sirius Red	30 Minuten	60 Minuten
Entfernung überschüssiger Farbe	4 Minuten in fließendem Leitungswasser	2x 2 Minuten in angesäuertem Wasser, dann kurz in dH ₂ O
Gegenfärbung	15 Sekunden mit Fast Green	
Differenzierung	2x kurz Leitungswasser	
Dehydrierung	Je 2-3 Sekunden: 30 %, 70 %, 95 %, 100 % EtOH	Je 2-3 Sekunden: 30 %, 70 %, 95 %, 100 % EtOH
Klärung	10 Minuten Roti-Histol	10 Minuten Roti-Histol
Eindecken	Entellan + Deckglas	Entellan + Deckglas

Nach dem Färbeprozess wurden die Präparate mit Entellan bedeckt und mit einem Deckglas versehen, um sie für die mikroskopische Auswertung zu konservieren.

Für die Auswertung der Sirius-Red-Färbung wurden pro Schnitt acht repräsentative Bildausschnitte bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Analyse erfolgte mithilfe der Software *Leica Application Suite 4.5*. Dabei wurden die rot gefärbten, kollagenhaltigen Bereiche durch das System automatisch erkannt und als fibrotische Areale markiert. Um die Analyse auf interstitielle Kollageneinlagerungen zu fokussieren, wurden Gefäßbereiche möglichst vermieden. Anschließend wurde deren Fläche in Bezug auf die Gesamtgewebefläche berechnet und als prozentualer Anteil dokumentiert.

Bei der Auswertung der Dünndarmproben wurden in jedem Bild drei kollagenhaltige Bereiche ausgewählt und die Dicke der Kollagenanlagerungen manuell vermessen (μm), um die fibrotischen Veränderungen quantitativ zu erfassen.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 Ly6G- und Cleaved Caspase-3-Färbungen von Lebergewebe

Zur Detektion neutrophiler Granulozyten wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G (Ly6G) durchgeführt. Ly6G ist ein spezifischer Oberflächenmarker, der nahezu ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und somit eine gezielte Identifikation dieser Immunzellpopulation im Gewebe ermöglicht (Pollenus et al., 2019). Die Paraffinschnitte wurden zunächst entfärbt und durch eine aufsteigende Alkoholreihe rehydratisiert. Anschließend erfolgte eine Antigen-Retrieval-Behandlung (Antigendemaskierung), um die Epitope für die Antikörperbindung zugänglich zu machen. Darauf folgten Blockierungsschritte zur Minimierung unspezifischer Bindungen, gefolgt von der Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper gegen Ly6G und anschließend mit einem passenden Sekundärantikörper. Der Nachweis des Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgte mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung, wobei sich positiv gefärbte Zellen durch eine braune Färbung darstellen. Eine abschließende Gegenfärbung mit Hämatoxylin diente der Kontrastierung der Zellkerne.

Die detaillierten Arbeitsschritte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Um apoptotische Prozesse im Lebergewebe nachzuweisen, wurde zusätzlich eine Färbung gegen Cleaved Caspase-3 durchgeführt. Diese Färbung dient der Identifikation von Zellen, in denen die Caspase-3 in ihre aktive, gespaltene Form überführt wurde – ein etablierter Marker für programmierte Zellalterung bzw. -tod (Akram et al., 2024).

Die Durchführung orientierte sich am bereits beschriebenen Protokoll der Ly6G-Färbung, wobei einige protokollspezifische Anpassungen vorgenommen wurden: Statt der Antigenmaskierung in Tris-EDTA-Puffer (siehe Anhang, Tabelle 6) wurde hier Mono-Natriumcitrat (siehe Anhang, Tabelle 7) verwendet. Die Objektträger wurden dabei insgesamt viermal in der Mikrowelle erhitzt: Zwei Durchläufe bei 800 Watt für jeweils 2 Minuten und 20 Sekunden, jeweils mit einer 3-minütigen Abkühlphase dazwischen, gefolgt von zwei weiteren Durchläufen bei 500 Watt, ebenfalls mit entsprechender Abkühlung. Nach dem Blockieren wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Cleaved Caspase-3 im Unterschied zur Ly6G-Färbung über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Der verwendete Sekundärantikörper wurde anschließend für 30 Minuten appliziert. Die Färbung mit DAB zur Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgte in diesem Fall für 1 Minute, bevor die

Reaktion durch Spülen in Wasser gestoppt und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt wurde. Die detaillierten Arbeitsschritte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Protokoll der Ly6G- und Cleaved Caspase-3-Färbung

Verfahrensschritt	Ly6G-Färbung	Cleaved Caspase-3-Färbung
Entparaffinierung	20 Minuten Roti-Histol	20 Minuten Roti-Histol
Rehydrierung	Je 5 Minuten: 100 %, 95 %, 70 % EtOH 10 Minuten dH ₂ O	Je 5 Minuten: 100 %, 95 %, 70 % EtOH 10 Minuten dH ₂ O
Antigenmaskierung	Tris-EDTA, Mikrowelle bis Aufkochen, 20 Minuten abkühlen	Mono-Natriumcitrat, Mikrowelle: 2x 2:20 Minuten bei 800 W + 2x 2:20 Minuten bei 500 Watt, 20 Minuten abkühlen + dazwischen 3 Minuten abkühlen
Spülen	10 Minuten dH ₂ O	10 Minuten dH ₂ O
	Umranden der Schnitte mit Fettstift	Umranden der Schnitte mit Fettstift
Waschen	10 Minuten PBST	10 Minuten PBST
Proteinblockade mit PBA	15 Minuten bei RT in feuchter Kammer	15 Minuten bei RT in feuchter Kammer
Primärantikörper	1,5 Stunden mit Ly6G-Antikörper bei RT in feuchter Kammer	Über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer mit Cleaved Caspase-3-Antikörper
Waschen	10 Minuten PBST	10 Minuten PBST
DAB-Färbung	4 Minuten Inkubation mit DAB	1 Minuten Inkubation mit DAB

Abstoppen & Spülen	In dH ₂ O stoppen, dann durchspülen	In dH ₂ O stoppen, dann durchspülen
Gegenfärbung	20 Sekunden Hämatoxylin	20 Sekunden Hämatoxylin
	10 Sekunden	10 Sekunden
	Leitungswasser I	Leitungswasser I
	10 Sekunden	10 Sekunden
	Leitungswasser II	Leitungswasser II
	10 Sekunden dH ₂ O	10 Sekunden dH ₂ O
Klärung	10 Minuten Roti-Histol	10 Minuten Roti-Histol
Eindecken	Entellan + Deckglas	Entellan + Deckglas

Nach dem Färbeprozess wurden die Präparate mit Entellan bedeckt und mit einem Deckglas versehen, um sie für die mikroskopische Auswertung zu konservieren.

Die Auswertungen der Ly6G- und Cleaved Caspase-3-Färbungen erfolgten jeweils mikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung. Für die Ly6G-Färbung wurden pro Leberschnitt acht repräsentative Bildfelder ausgewählt und manuell analysiert. Dabei wurde die Anzahl der Ly6G-positiven Zellen, erkennbar an der braunen Färbung, bestimmt. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche Zellzahl pro Bildfeld angegeben und für die statistische Auswertung herangezogen.

Die Analyse der Cleaved Caspase-3-Färbungen erfolgte bildgestützt mithilfe der Software *Leica Application Suite 4.5*. Auch hier wurden pro Leberschnitt acht repräsentative Bildfelder aufgenommen und ausgewertet. Die Software identifizierte die braun gefärbten apoptotischen Areale, die als Cleaved Caspase-3-positive Regionen definiert wurden. Der Anteil dieser Positivbereiche wurde anschließend in Relation zur Gesamtfläche berechnet und als prozentualer Wert angegeben.

3.5 Biochemische Analysen

3.5.1 Triglycerid-Extraktion aus Lebergewebe (FOLCH-Methode) einschließlich Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Triglyceridgehalts im Lebergewebe wurde eine modifizierte FOLCH-Methode angewandt (Folch et al., 1957). Zunächst wurden 500 μL 2 $\times$ PBS (siehe Anhang, Tabelle 8) auf Eis vorgelegt und ein zuvor abgewogenes Stück gefrorenes Lebergewebe hinzugegeben. Die Homogenisierung erfolgte für 10 Sekunden, gefolgt von der Zugabe weiterer 500 μL 2 $\times$ PBS und kurzem Vortexen. Anschließend wurde die Probe zweimal für je 20 Sekunden ultraschallhomogenisiert (100 % Amplitude, 0,7 Zyklen), dazwischen jeweils kurz gevortext. Von dem Homogenisat wurden 500 μL für die Lipidextraktion entnommen und der Rest wurde auf Eis für die spätere Proteinbestimmung zurückgestellt. Die entnommene Probe wurde für 5 Minuten bei 80 °C erhitzt und anschließend 10 Minuten auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Zur Lipidextraktion wurden 250 μL Methanol zugegeben und nach zweimaligem 10-sekündigem Vortexen 5 Minuten im Ultraschallbad (RT) inkubiert. Danach wurden 500 μL Chloroform ergänzt und erneut je zweimal 10 Sekunden gevortext. Es folgte eine 10-minütige Ultraschallbehandlung bei Raumtemperatur, unterbrochen von weiteren Vortexschritten.

Die Proben wurden anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 20 °C für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Von der entstandenen Zweiphasenlösung wurden 200 μL der unteren, lipidreichen Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden im Vakuumkonzentrator vollständig eingedampft. Das getrocknete Lipidpellet wurde in 200 μL 5 % BSA gelöst, gevortext und für 10 Minuten bei 55 °C erhitzt. Nach anschließender Ultraschallhomogenisierung wurden die Proben erneut für 1 Stunde bei 55 °C inkubiert und über Nacht bei –80 °C eingefroren.

Am Folgetag wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 55 °C erwärmt, gevortext, ultraschallhomogenisiert und anschließend ein weiteres Mal für 1 Stunde bei 55 °C inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung der Triglyceride wurden 2 μL Probe, Standard und Leerwert jeweils in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 200 μL eines enzymatischen Reagenzes versetzt und für 10 Minuten bei 37 °C im Plattenleser inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Zur Normierung der Triglyceridwerte wurde die Gesamtproteinmenge des Leberhomogenisats durch einen Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurde das verbleibende Homogenisat für 5 Minuten bei 4 °C bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Mit destilliertem Wasser wurde der Überstand im Verhältnis 1:4 und das Farbreagenz zuvor 1:5 verdünnt. Der verwendete Extraktionspuffer (2× PBS) wurde im Verhältnis 1:40 verdünnt, um als Referenzlösung zu dienen.

Als Proteinstandard diente eine BSA-Standardreihe (siehe Tabelle 3). In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 5 µL der BSA-Standards sowie der zu analysierenden Proben als Triplikat pipettiert. Anschließend wurden pro Well 200 µL des verdünnten Farbreagenzes zugegeben. Nach 5-minütigem Schütteln im Plattenreader wurde die Absorption bei 590 nm gemessen. Die Proteinmengen der Proben wurden anhand der Standardkurve berechnet und zur Normierung der Triglyceridwerte verwendet (µg Triglycerid pro mg Gesamtprotein).

Tabelle 3: Herstellung der BSA-Standardreihe für die Proteinbestimmung

	BSA-Standardreihe	Verdünnter Extraktionspuffer	BSA-Konzentration (mg BSA/mL)
A	2 µL BSA-Aliquot*	198 µL	1,0
B	100 µL A	100 µL	0,5
C	100 µL B	100 µL	0,25
D	100 µL C	100 µL	0,125
E	100 µL D	100 µL	0,0625
F		100 µL	0

*100mg BSA/mL in dH₂O; BSA = bovines Serumalbumin

3.5.2 Bestimmung der ALT-Konzentration im Pfortaderplasma

Die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase-(ALT)-Aktivität im Pfortaderplasma erfolgte durch ein Routinelabor der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Wien, Österreich). Die Analyse wurde nach standardisierten diagnostischen Verfahren durchgeführt, um Rückschlüsse auf mögliche leberzelluläre Schädigungen zu ermöglichen.

3.5.3 Bestimmung der TLR2- und TLR4-Liganden-Konzentration im Pfortaderplasma

Zur Bestimmung der Konzentration funktionell aktiver TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderplasma wurde ein zellbasierter Reporter-Gen-Assay (HEK-Blue™ hTLR2 und hTLR4, InvivoGen) verwendet (Jung et al., 2021). Die Messung der SEAP-Aktivität erfolgte nach 18-24-stündiger Inkubation der Proben (10 µL) mit den jeweiligen Zellen mithilfe des Farbreagens QUANTI-Blue™. Die absorbierten Werte wurden bei 620–655 nm photometrisch bestimmt. Die Durchführung des Assays sowie die Auswertung erfolgten durch Mitarbeitende der Arbeitsgruppe Bergheim.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Extraktion aus Dünndarmgewebe

Die Extraktion von RNA stellt einen essenziellen ersten Schritt zur Analyse der Genexpression dar. Durch die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebeproben kann mittels nachgeschalteter Verfahren wie der reversen Transkription und der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) die Expression spezifischer Gene untersucht werden. Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, ist die Gewinnung von qualitativ hochwertiger, intakter RNA entscheidend, da degradierte oder kontaminierte RNA die Aussagekraft molekularbiologischer Analysen erheblich beeinträchtigen kann (Rio et al., 2010).

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Dünndarmproben wurde ein modifiziertes Trizol-Protokoll angewendet. Pro Ansatz wurden in einem 2 mL-Eppendorfgefäß 1 mL Trizol-Reagenz sowie zwei Zirkonoxidperlen vorgelegt und auf Eis gehalten. Anschließend wurde ein gefrorenes Stück Dünndarmgewebe entnommen und direkt in das vorbereitete Reaktionsgefäß gegeben. Die Homogenisierung erfolgte mittels TissueLyser II für 30 Sekunden, gefolgt von einer kurzen Pause zur Kühlung und einer zweiten 30-sekündigen Homogenisierungsphase. Danach wurde die Probe 10 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Zelllyse zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden 200 µL Chloroform zugegeben, erneut 30 Sekunden homogenisiert sowie 10 Sekunden gevortext. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation bei $120.000 \times g$ (RCF) für 10 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Die farblose, obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt.

Zur RNA-Fällung wurden 500 µL Isopropanol hinzugegeben und die Probe kurz gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation unter denselben Bedingungen ($120.000 \times g$, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, und das RNA-Pellet wurde durch Zugabe von 900 µL 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet durch Vortexen vollständig in Ethanol suspendiert und für 8 Minuten bei $7.500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach Entfernung des Ethanols wurde das RNA-Pellet über Kopf auf ein steriles Filterpapier gestellt und ca. 10 Minuten luftgetrocknet. Abhängig von seiner Größe wurde das Pellet anschließend in 20-100 µL DNase- und RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Auflösung erfolgte durch Inkubation bei 55 °C für 10 Minuten bei 300 rpm. Für sämtliche Schritte des Protokolls wurden ausschließlich sterile Filterspitzen verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde anschließend eine qualitative Kontrolle mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 4 µL der aufgelösten RNA-Probe mit 1 µL DNA-Dye auf Parafilm gemischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über 1 Stunde bei 110 V in einer mit 1× TBE-Puffer (siehe Anhang, Tabelle 9) gefüllten Gelkammer. Die Visualisierung der RNA erfolgte im Anschluss über UV-Detektion mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System.

3.6.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) stellt eine grundlegende Voraussetzung für die Analyse der Genexpression dar, da viele molekularbiologische Verfahren wie die qPCR eine DNA-Vorlage benötigen. Da mRNA instabil ist und nicht direkt für PCR-basierte Analysen verwendet werden kann, wird sie mittels reverser Transkription in stabile cDNA umgeschrieben. Die Qualität und Quantität der cDNA ist dabei entscheidend für die Aussagekraft nachfolgender Expressionsanalysen (Mülhardt, 2013).

Für die cDNA-Synthese wurde die aus Dünndarmproben isolierte RNA in einer 1:50-Verdünnung (2 µL RNA + 98 µL RNase- und DNase-freies Wasser) auf eine UV-Platte überführt. Als Leerwert diente ein Blank mit 100 µL RNase- und DNase-freiem Wasser. Die gesamte Synthese wurde ausschließlich mit Filterspitzen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Anschließend wurde die RNA so verdünnt, dass 1,11 µg RNA in 8 µL RNase- und DNase-freiem Wasser enthalten waren. Zur Entfernung möglicher DNA-Kontaminationen

wurden 1 µL 10× DNase-Reaktionspuffer und 1 µL RNase-freie DNase zugegeben und die Mischung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die DNase wurde anschließend durch Zugabe von 1 µL Stopplösung und eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Währenddessen wurde ein Mastermix auf Eis hergestellt, bestehend aus MgCl₂, Reverse Transcriptase Buffer, einem dNTP-Mix, RNasin, Random Primern und AMV Reverse Transcriptase. Nach der Inaktivierung wurde der Mastermix zur RNA-Probe gegeben, und die Reverse Transkription im Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über drei Temperaturstufen: zunächst 10 Minuten bei 25 °C zur Primeranlagerung, anschließend 15 Minuten bei 42 °C zur Synthese der cDNA und abschließend 5 Minuten bei 95 °C zur Enzyminaktivierung. Die Reaktion wurde bei 4 °C beendet. Zur Verdünnung der entstandenen cDNA wurden 80 µL RNase-freies Wasser zugegeben. Die fertige cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.6.3 PCR-Analysen

Zur Analyse der Genexpression wurde eine qPCR unter Verwendung des SYBR Green-Systems durchgeführt, die der Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäuren und der Quantifizierung der amplifizierten DNA dient (Arya et al., 2005). Pro Reaktion wurden 10 µL iTaq Universal SYBR Green Supermix mit 3 µL RNase- und DNase-freiem Wasser, 1 µL Forward-Primer und 1 µL Reverse-Primer des jeweiligen Zielgens gemischt. Von dieser Reaktionsmischung wurden 15 µL in Duplikat in eine 96-Well-Platte pipettiert und jeweils mit 5 µL cDNA ergänzt. Als Negativkontrolle (Non-Template Control, NTC) wurden 5 µL RNase- und DNase-freies Wasser anstelle von cDNA verwendet. Nach dem Aufbringen einer optisch versiegelnden Folie wurde die Platte kurz zentrifugiert und in das CFX-Real-Time-PCR-Gerät überführt. Die Temperaturprofile wurden gemäß den optimalen Bedingungen der jeweiligen Primer festgelegt (siehe Tabelle 4 sowie Abbildung 8 und 9). Die Amplifikation wurde zyklusabhängig mittels SYBR Green-Fluoreszenz verfolgt. Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei das Referenzgen 18S zur Normalisierung diente. Sämtliche Pipettierschritte wurden unter Verwendung von Filterspitzen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Tabelle 4: Temperaturprofil der Real-Time qPCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Polymerase	95	30	
Aktivierung			
Denaturierung	95	5	
Annealing/Elongation			
18S	55	30	40
COL1A1	64	30	49
	95	10	
Schmelzkurvenanalyse	65-95	5	

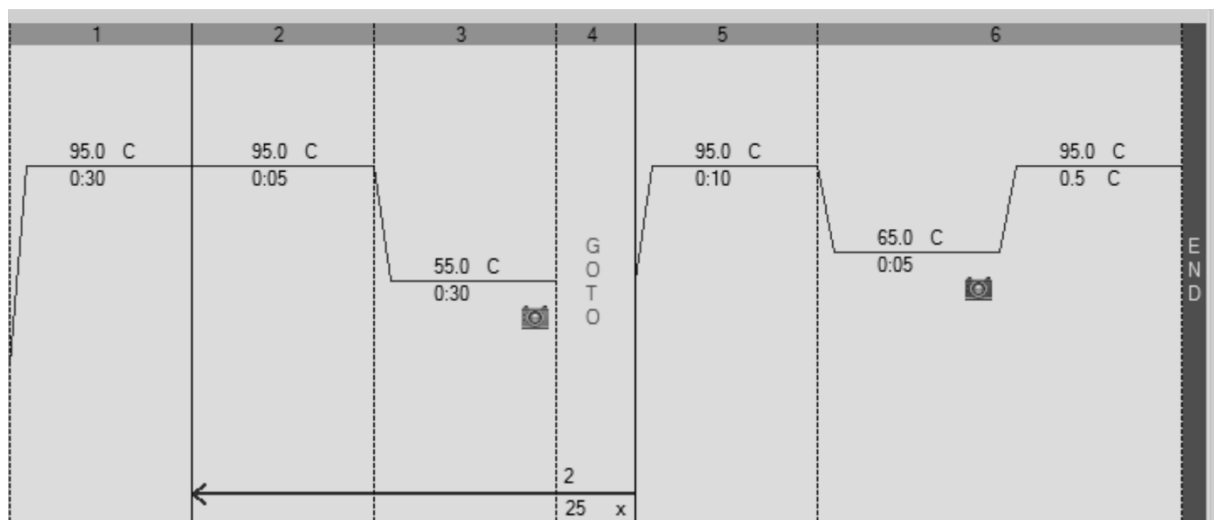


Abbildung 8: Temperaturprofil für 18S

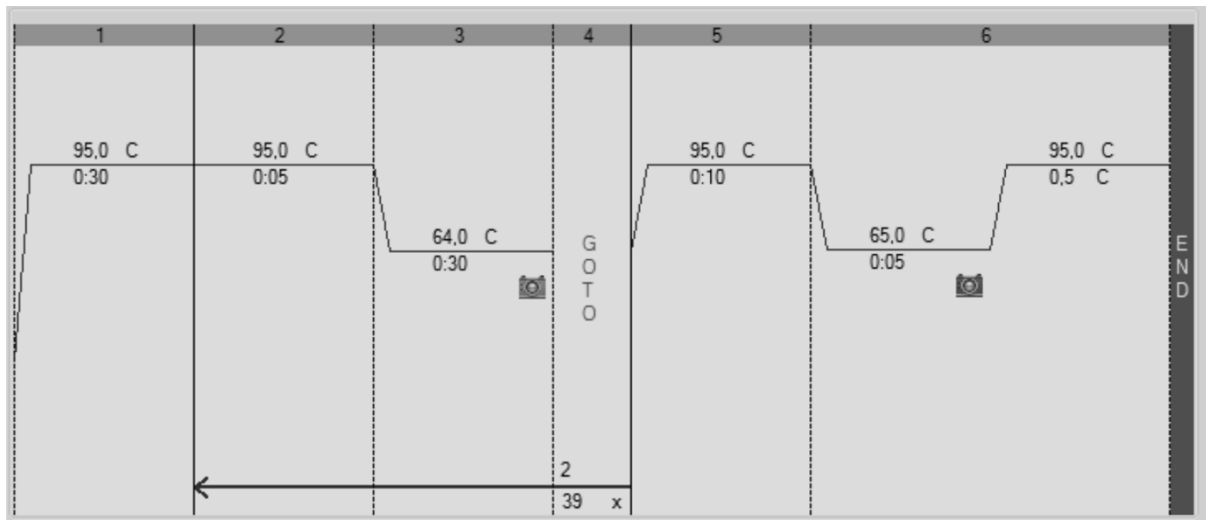


Abbildung 9: Temperaturprofil für COL1A1

3.7 Datenauswertung und Statistik

Die Datenanalyse sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit *GraphPad Prism* (Version 7). Zur Identifikation potenzieller Ausreißer wurde der Grubb's-Test angewendet; identifizierte Ausreißer wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Statistische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem *t*-Test geprüft, vorausgesetzt die Daten wiesen eine Normalverteilung auf. Waren die Daten nicht normalverteilt wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt; ein *p*-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf den Leberstatus der Mäuse wurden verschiedene histologische und entzündungsbezogene Parameter erfasst. Im Rahmen der Probenentnahme wurden das Körper- sowie das Lebergewicht der Tiere bestimmt, um anschließend das Leber-zu-Körpergewichtsverhältnis zu berechnen. Zwischen der Ethanol-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe, die Maltodextrin erhielt, zeigten sich weder im Körpergewicht noch im Leber-/Körpergewichtsverhältnis signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 5). Zur besseren Einordnung altersabhängiger Veränderungen wurde zusätzlich eine Gruppe vier Monate alter, unbehandelter (naiver) Mäuse als Referenz herangezogen.

Tabelle 5: Körpergewicht und Leber-/Körpergewichtsratio der C57BL/6J-Mäuse

	4 Monate	24 Monate + Maltodextrin	24 Monate + EtOH
Körpergewicht [g]	31.8 ± 0.6	35.5 ± 0.5	35.4 ± 1.1
Leber- /Körpergewichtsratio [%]	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2

Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, n = 8-9.

4.1 Einfluss von juvenilem Alkoholkonsum auf die altersassoziierte Veränderung der Leberhistologie, Parameter der Leberschädigung und Entzündung

Zur Bewertung des Einflusses juvenilen Alkoholkonsums auf altersassoziierte Veränderungen der Leberstruktur wurde eine HE-Färbung an histologischen Leberpräparaten durchgeführt. Die repräsentativen Schnittbilder zeigten keine deutlich veränderten Strukturen in der Ethanolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der anhand der Färbungen erhobene Liver Score deutete jedoch auf einen Trend hin, der auf mögliche histologische Unterschiede hindeutet (siehe Abbildung 10).

Zur Untersuchung der hepatischen Lipidakkumulation wurde eine Triglycerid-Extraktion mit anschließender photometrischer Quantifizierung durchgeführt. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 11).

Um zu überprüfen, ob die anhand der HE-Färbung festgestellten Veränderungen mit einer entzündlichen Reaktion im Lebergewebe einhergehen, wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten mittels Ly6G-Färbung quantifiziert. In der mit Ethanol behandelten Gruppe zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$; siehe Abbildung 12).

Zur weiterführenden Bewertung der Entzündungsaktivität und zur Validierung der Ly6G-Ergebnisse wurden zusätzlich Marker der Apoptose im Lebergewebe analysiert. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch immunhistochemischen Nachweis aktivierter Cleaved Caspase-3. Auch hier zeigte die Ethanolgruppe eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellbereiche im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Maltodextrin ($p \leq 0,05$; siehe Abbildung 12).

Ergänzend erfolgte eine quantitative Analyse potenzieller Leberschäden durch Bestimmung der Kollagenanreicherung mittels Sirius-Red-Färbung sowie der ALT-Aktivität im Pfortaderplasma. Die Sirius-Red-Färbung, als Marker für fibrotische Veränderungen, zeigte eine signifikant stärkere Kollagenanreicherung im Vergleich zur isokalorisch mit Maltodextrin behandelten Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$; siehe Abbildung 13). Die vierwöchige Ethanolgabe im Jugendalter führte im Alter außerdem zu einer signifikant erhöhten ALT-Aktivität im Pfortaderplasma ($p \leq 0,05$; siehe Abbildung 13).

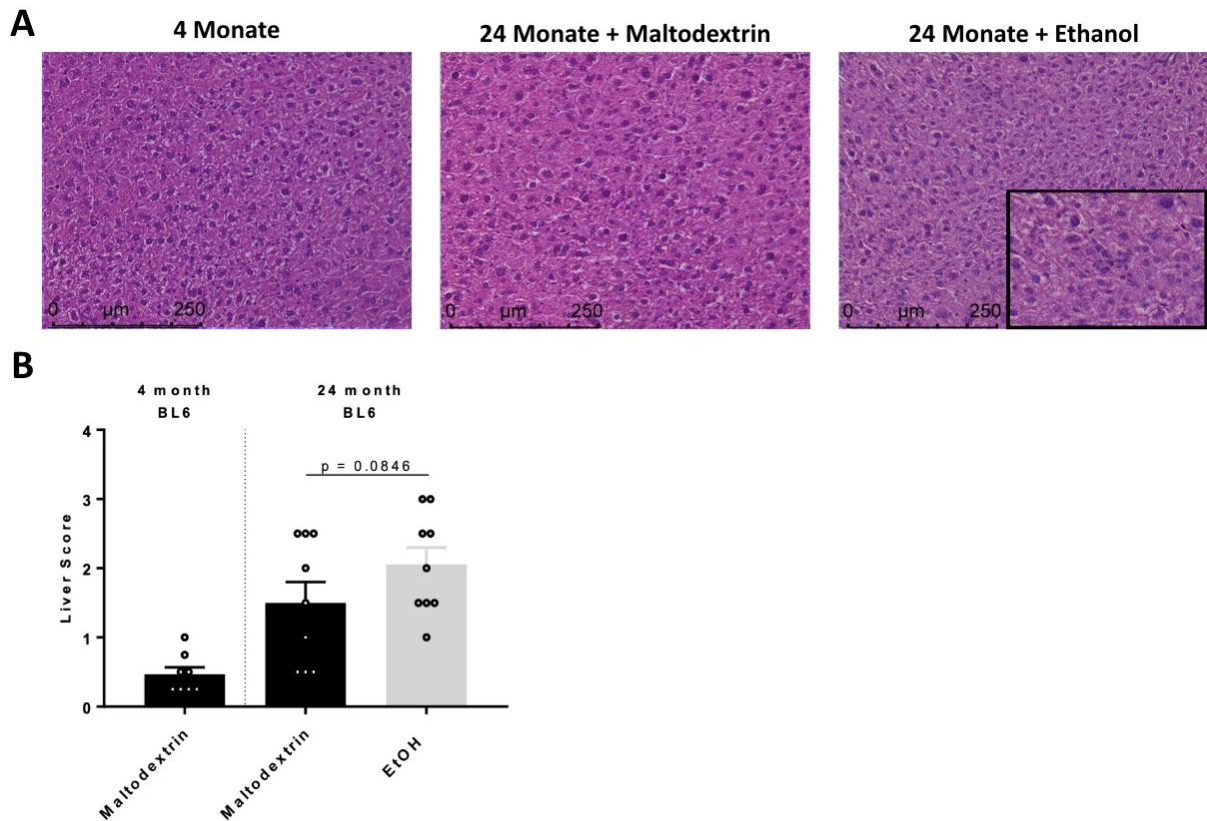


Abbildung 10: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Leberhistologie von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Repräsentative Bilder der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung (200× Vergrößerung).

(B) Histologischer Leberscore zur Bewertung von Gewebeveränderungen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n = 8–9 pro Gruppe; * p ≤ 0,05.

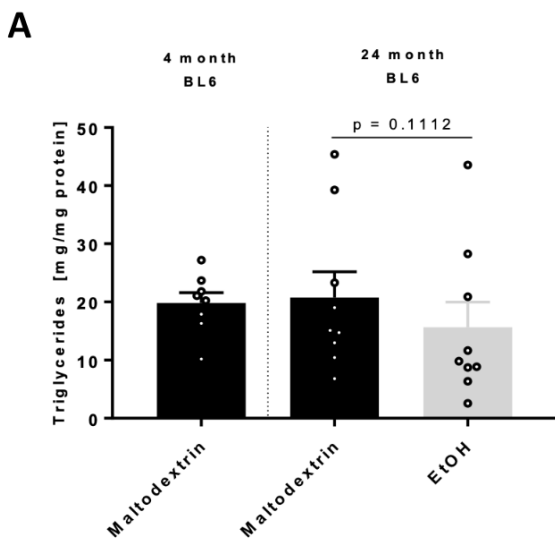


Abbildung 11: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf hepatische Lipidakkumulation von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Quantifizierung der hepatischen Triglyceridkonzentration. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt; $n = 8-9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

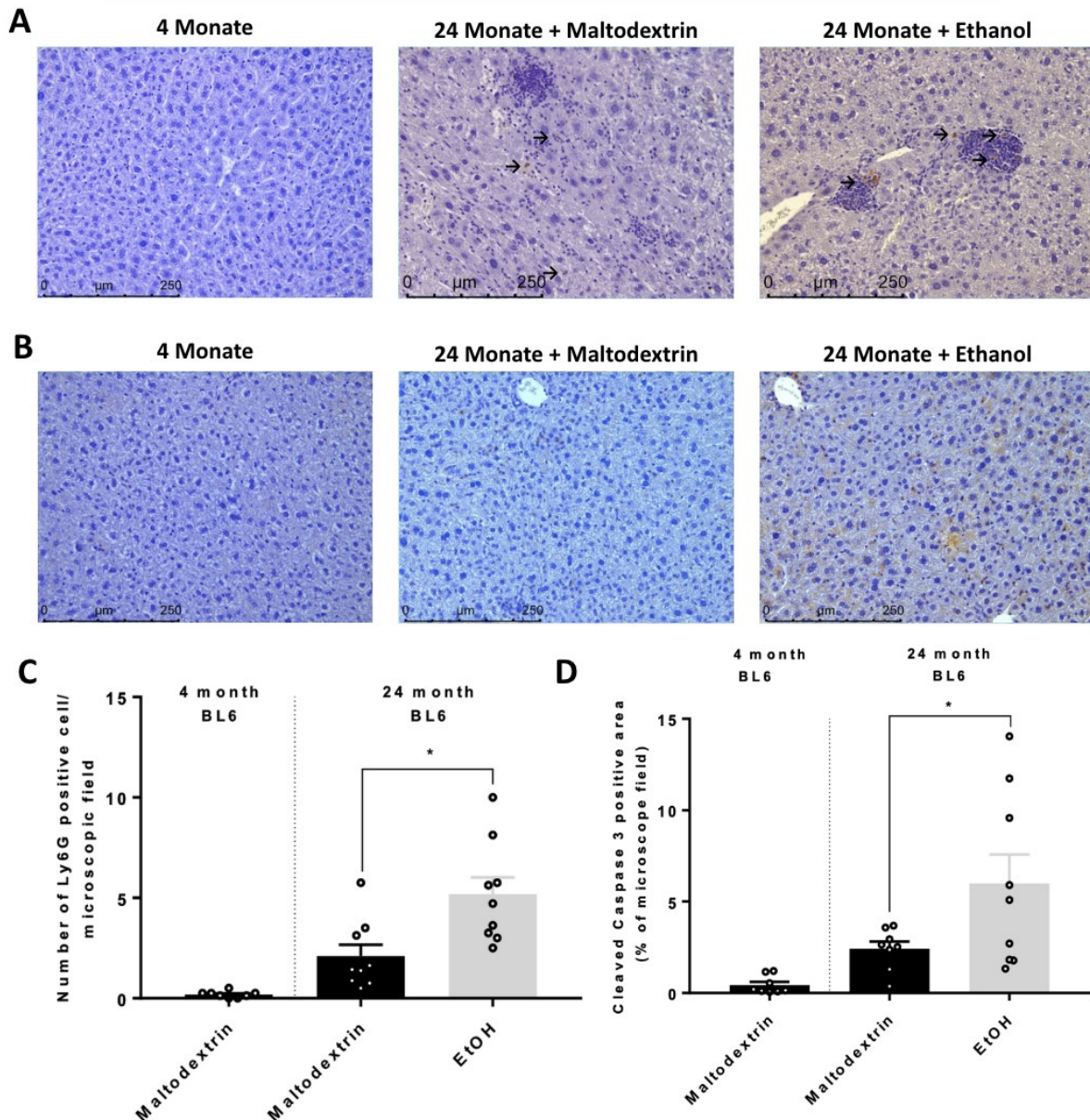


Abbildung 12: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf Entzündungs- und Apoptosemarkern in der Leber von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Repräsentative Bilder der Ly6G-Färbung zur Darstellung neutrophiler Granulozyten (200× Vergrößerung), (B) Repräsentative Bilder der Cleaved Caspase-3-Färbung zur Darstellung apoptotischer Zellbereiche (200× Vergrößerung), (C) Quantifizierung der Neutrophilen pro mikroskopischem Sichtfeld in Leberschnitten, (D) Quantifizierung der

Cleaved Caspase-3-positiven Areale als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche. Schwarze Pfeile zeigen Neutrophile an. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt; $n = 8-9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

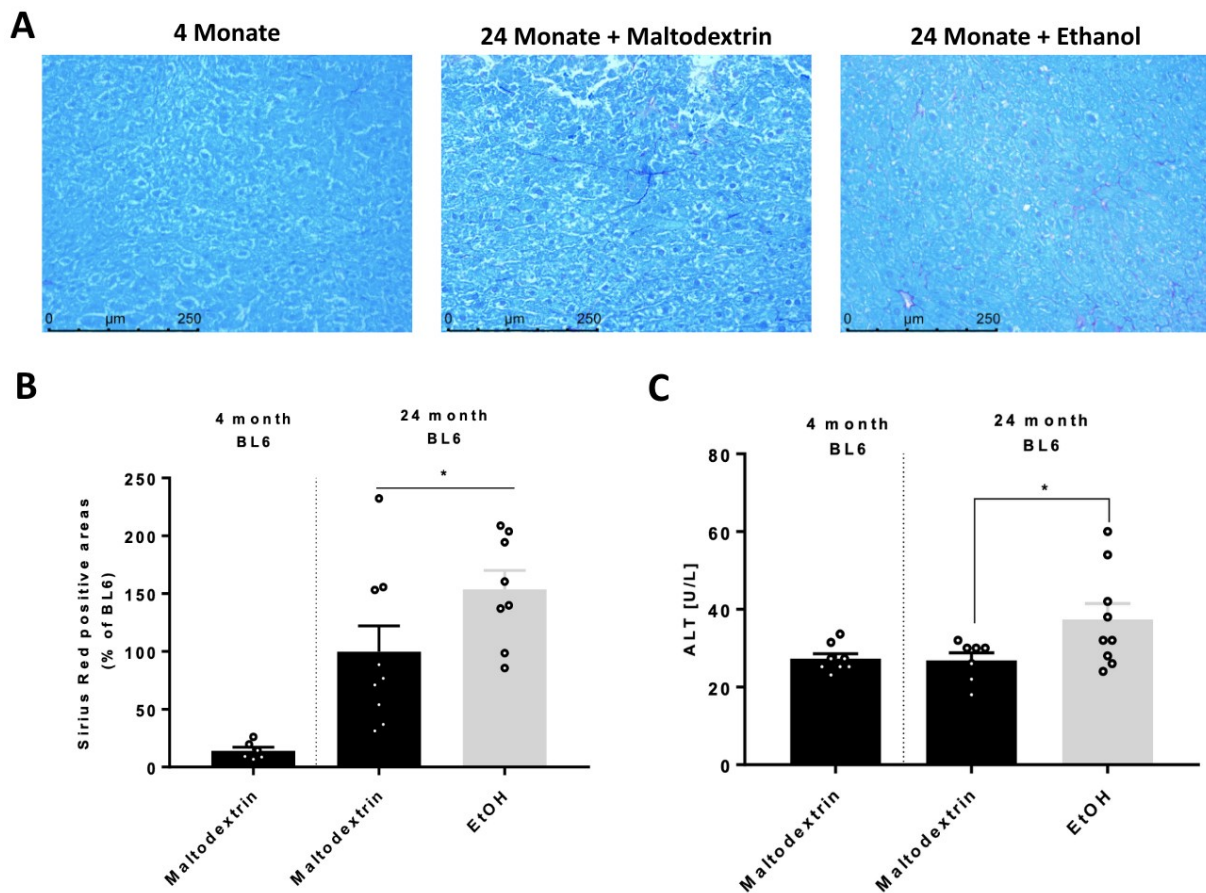


Abbildung 13: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf fibrotische Veränderungen und Leberschädigungsmarker in der Leber von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Repräsentative Bilder der Sirius-Red-Färbung des Lebergewebes (200× Vergrößerung), (B) Quantifizierung der Sirius-Red-positiven Areale (% der BL6), (C) Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Pfortaderplasma als Marker hepatozellulärer Schädigung. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt; $n = 8-9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

4.2 Einfluss von juvenilem Alkoholkonsum auf die Darmbarriere

Zur Untersuchung, ob die juvenile „Binge-Drinking Phase“ langfristig die Darmbarriere beeinträchtigt und mit einer erhöhten Translokation mikrobieller Bestandteile assoziiert ist, wurden die Spiegel von TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderplasma gemessen. Dabei zeigten Mäuse der Ethanolgruppe eine signifikant erhöhte Konzentration an TLR2-Liganden im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Maltodextrin ($p \leq 0,05$). Die TLR4-Ligandenkonzentration unterschied sich hingegen nicht signifikant zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 14).

Ergänzend wurde eine Sirius-Red-Färbung durchgeführt, um Kollagenablagerungen im Gewebe sichtbar zu machen. In der Ethanolgruppe zeigte sich eine signifikant höhere Kollagenanreicherung im Dünndarm im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$; siehe Abbildung 15).

Zur Beurteilung möglicher fibrotischer Veränderungen im Dünndarm wurde die Genexpression von COL1A1 als Marker für Kollagensynthese mittels qPCR analysiert. Zwischen den beiden Gruppen konnte hierbei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 16).

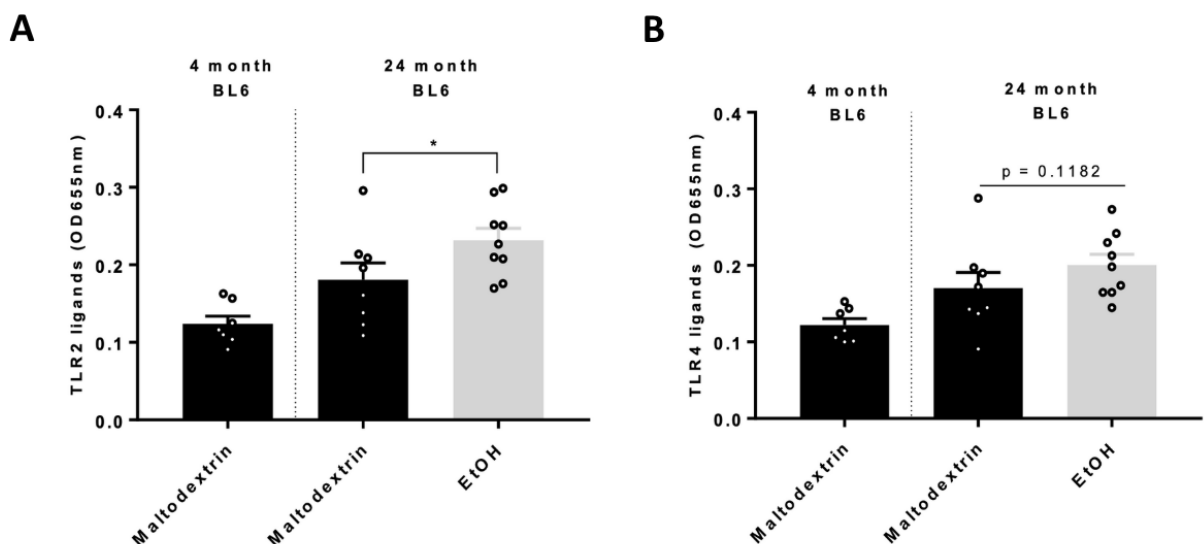


Abbildung 14: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf Marker der intestinalen Barrierefunktion von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Konzentration von TLR2-Liganden und (B) TLR4-Liganden im Pfortaderplasma. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt; $n = 8–9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

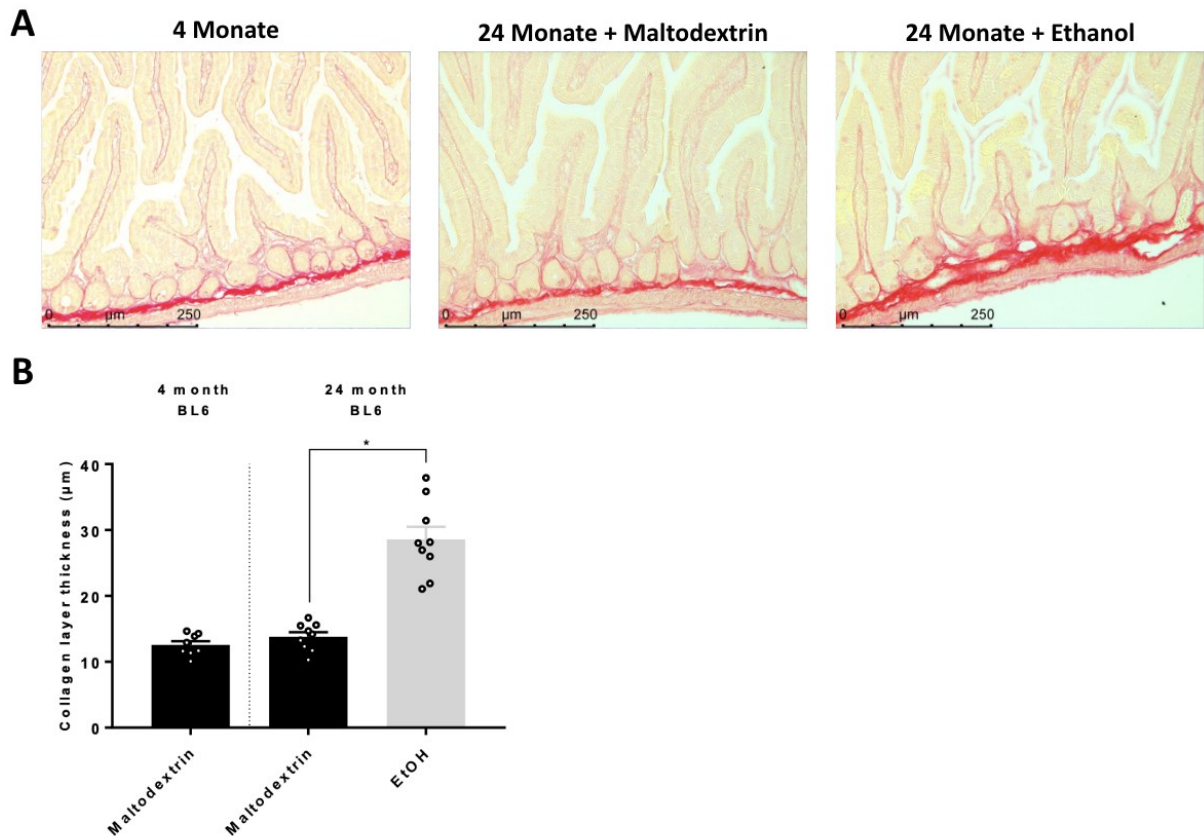


Abbildung 15: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Kollagenanreicherung im Dünndarm von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Repräsentative Sirius-Red-Färbungen (200× Vergrößerung).

(B) Quantifizierung kollagenpositiver Areale (% der Gesamtfläche), basierend auf manueller Messung in drei Bildbereichen. Daten als Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 8–9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

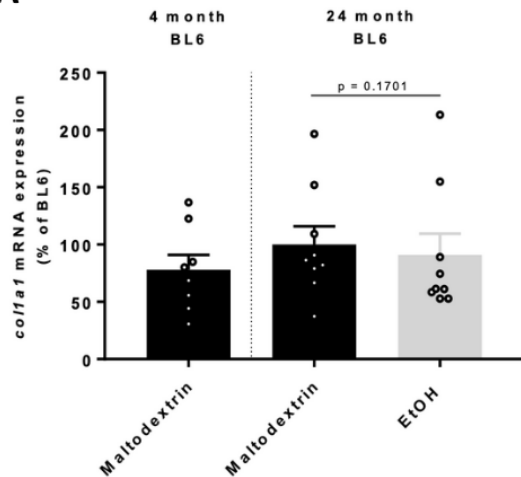
A

Abbildung 16: Auswirkungen eines 4-wöchigen „Binge-Drinking“ im frühen Erwachsenenalter auf die Genexpression von COL1A1 im Dünndarm als Marker fibrotischer Aktivität von 24 Monate alten Mäusen

Untersucht wurden 24 Monate alte Tiere, die im Alter von 3–4 Monaten zweimal wöchentlich 6 g/kg KG Ethanol oder Maltodextrin erhalten hatten, sowie 4 Monate alte naive Mäuse. (A) Relative mRNA-Expression von COL1A1 im Dünndarm männlicher C57BL/6J-Mäuse. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt; $n = 8-9$ pro Gruppe; * $p \leq 0,05$.

5. Diskussion

Die Weltbevölkerung altert rasch. Derzeit sind rund 10,3 % über 65 Jahre alt (United Nations Population Fund, o. J.). Prognosen deuten darauf hin, dass der Anteil älterer Erwachsener weltweit den von Kindern übersteigen wird (WHO, 2024b). Im Gegensatz zur gesunden Lebensspanne nimmt die im „ungesunden“ Zustand verbrachte Lebenszeit überproportional zu (GBD 2021 Demographics Collaborators, 2024; GBD 2021 Forecasting Collaborators, 2024). Parallel nehmen die gesundheitlichen Folgen von Alkohol im jungen Erwachsenenalter zu (Yeo et al., 2022). So sind in der Altersgruppe der 20- bis 30-Jährigen etwa 13 % der Todesfälle alkoholbedingt (WHO, 2024b). Die langfristigen Folgen des juvenilen Binge-Drinkings mit anschließender Abstinenz auf Leber und Darm sind jedoch im Hinblick auf altersassoziierte Veränderungen noch unzureichend untersucht. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen juveniler Ethanolexposition auf die Alterung von Leber und Darm in einem Mausmodell, das sowohl das Trinkmuster als auch den Alterungsprozess abbildet.

5.1 Das Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen des juvenilen Binge-Drinking auf den Alterungsprozess

Tiermodelle wie Maus und Ratte sind für Alkohol- und Alterungsforschung etabliert. Sie bieten genetische Homogenität und gute Reproduzierbarkeit, bilden relevante Aspekte menschlicher Pathophysiologie ab und erlauben die Analyse komplexer Prozesse unter kontrollierten Bedingungen (Delire et al., 2015; Farrell et al., 2018). Aufgrund des vergleichsweise kurzen Lebenszyklus lassen sich alterstypische Veränderungen rasch untersuchen. Der Stamm C57BL/6J ist hierfür gut charakterisiert und robust (Flurkey & Currer, 2004). Alte männliche C57BL/6J-Mäuse zeigten selbst ohne spezifische Eingriffe Zeichen einer Leberdegeneration, die den beim Menschen beschriebenen Veränderungen ähneln (Jin et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Ethanolexposition im Alter von drei bis vier Monaten, was beim Menschen etwa 20 bis 30 Jahren entspricht (Flurkey & Currer, 2004). Die Nachbeobachtung endete mit 24 Monaten und liegt damit im Bereich über 65 Jahren beim Menschen (Flurkey & Currer, 2004).

Alternative Systeme wie Zellkulturen oder Organoide sind für die Bearbeitung dieser Fragestellung ungeeignet, da sie die komplexe Interaktion verschiedener Organsysteme nicht

adäquat abbilden können (Starkel & Leclercq, 2011). Humanstudien sind durch ethische und methodische Einschränkungen sowie fehlende Langzeitgewebe limitiert (Farrell et al., 2018). Registerdaten wie bei Hagström et al. (2018) liefern Hinweise auf Langzeiteffekte, erlauben aber keine mechanistische Einordnung. Darüber hinaus variiert die Alkoholeliminationsrate erheblich zwischen den Spezies. Tierexperimentelle Studien zeigten bereits, dass Nagetiere Alkohol bis zu fünfmal schneller als Menschen metabolisieren können (Nelson et al., 1957). Während beim Menschen Konzentrationen von bis zu 6 g/kg schwere Intoxikationen oder Tod verursachen können, tolerieren Mäuse solche Dosen gut (Hege et al., 2018; Landmann et al., 2017). So lassen sich Blutalkoholspiegel erreichen, die exzessivem Konsum beim Menschen entsprechen.

Daten aus Österreich zeigen zwar mehr Binge-Drinking bei Jungen, dennoch sind Geschlechtsunterschiede wesentlich (Felder-Puig et al., 2024). Frauen haben aufgrund von Körperzusammensetzung und hormonellen Faktoren eine andere Pharmakokinetik und teils höhere Vulnerabilität gegenüber Organschäden (Erol & Karpyak, 2015). Ein Vergleich der hier gezeigten Effekte bei weiblichen Mäusen ist daher ein wichtiger nächster Schritt. Gleichzeitig müssen die Limitationen tierexperimenteller Ansätze berücksichtigt werden. Mäuse tolerieren höhere Dosen als Menschen und das Modell erfasst Einflüsse wie Genetik, Ernährung, Bewegung und Umwelt nur bedingt (Farrell et al., 2018). Trotz dieser Einschränkungen bietet das gewählte Modell männlicher C57BL/6J-Mäuse mit wiederholter Ethanolexposition eine geeignete Grundlage, um jugendliches Binge-Drinking und dessen langfristigen Effekte im Kontext der Alterung zu untersuchen, da die Mäuse insbesondere hepatisch humanähnliche histologische Veränderungen zeigen. Es ermöglicht die Analyse molekularer Mechanismen, bildet den Alterungsprozess ab und bleibt durch die Wahl männlicher Tiere mit früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe vergleichbar. Diese Rahmenbedingungen sind für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit entscheidend.

5.2 Einfluss von juvenilem Binge-Drinking auf die altersassoziierte Leberveränderung im Mausmodell

Die Gabe von 6 g/kg KG Ethanol im Jugendalter, zweimal pro Woche über 4 Wochen, führte bei männlichen C57BL/6J Mäusen im Alter zu verstärkter altersassoziiierter Gewebeschädigung und Entzündung der Leber.

Die Triglyceridgehalte unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen den Gruppen. Obwohl die Steatose als erste Reaktion der alkoholischen Leber gilt (Thomes et al., 2021), sind unsere Ergebnisse angesichts des langen Intervalls zwischen Exposition im dritten bis vierten Lebensmonat und Probenahme im 24. Lebensmonat plausibel, da alkoholinduzierte Fettablagerungen typischerweise rasch abgebaut werden (Wagnerberger et al., 2013; Thames et al., 2019). Unsere Daten sind damit vereinbar mit Arbeiten, die bei moderater Dosis keine Steatose fanden (McMahan et al., 2021). Bei höheren Expositionen wurden hingegen vermehrt kleine Fetttröpfchen beschrieben (Yang et al., 2024), die als frühe steatotische Veränderung grundsätzlich rückbildungsfähig sind und somit ebenfalls mit den im hohen Alter fehlenden Triglyceridunterschieden vereinbar bleiben.

Histologisch deutete der Liver Score der HE-Färbung auf einen nicht signifikanten Trend hin, der vor allem durch parallel nachgewiesene entzündliche Veränderungen gestützt wurde. Bei alten Mäusen beschrieben McMahan et al. (2021) fokale entzündliche Herde und erhöhte Interleukin-1 β -mRNA, während junge Tiere unauffällig blieben. Die dort beobachteten hepatischen Ansammlungen entzündungsrelevanter Zellen, vorwiegend Neutrophilen und Monozyten, deuteten auf frühe Stadien einer Leberentzündung hin (McMahan et al., 2021). Unsere Daten zeigten darüber hinaus, dass diese Entzündungsaktivierung trotz jahrelanger Abstinenz fortbesteht: In den Ly6G-Färbungen fanden sich in der Ethanolgruppe signifikant mehr neutrophile Granulozyten, was der bislang verbreiteten Annahme widerspricht, eine alkoholinduzierte Entzündung bilde sich nach Beendigung des Konsums vollständig zurück. Unterschiede zu McMahan et al. (2021) lassen sich unter anderem durch die dort niedrigere kumulative Ethanoldosis erklären (30 g/kg weniger). Für zukünftige Arbeiten sollte daher gezielt die akute Reaktion auf eine binge-ähnliche Ethanoldosis in jungen Mäusen (höher als bei McMahan et al., 2021, innerhalb des binge-relevanten Bereichs) charakterisiert werden, um diese unmittelbaren Effekte direkt mit den von uns im Alter beobachteten Veränderungen vergleichen zu können.

Neben Entzündung zeigte sich eine signifikant erhöhte Apoptose, nachweisbar über die Cleaved Caspase-3-Färbung. Dies weist auf aktivierte apoptotische Signalwege hin und stimmt mit früheren Befunden überein, dass alkoholinduzierte Schädigung langfristig Zellschädigung fördert und so die Progression von ALD unterstützt (Miyata & Nagy, 2020; Zhou et al., 2001). Die Sirius-Red-Färbung war ebenfalls signifikant verstärkt, was vermehrte Kollagenablagerung und fibrotische Umbauten anzeigt. Zwar ist eine gewisse Fibroseentwicklung im höheren Alter nicht ungewöhnlich (Schmucker, 2005; Tajiri & Shimizu, 2013), die ethanolbehandelten Tiere zeigten jedoch im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen eine ausgeprägtere Kollagenablagerung. Fibrose gilt als zentrale Vorstufe schwerer alkoholbedingter Lebererkrankungen (Lackner & Tiniakos, 2019). Dass fibrotische Signaturen trotz Abstinenz nachweisbar waren und in der Ethanolgruppe stärker ausfielen, spricht dafür, dass der juvenile Alkoholkonsum altersassoziierte Fibroseprozesse vorverlagert oder in ihrer Ausprägung verstärkt und über die Abstinenz hinaus aufrechterhält. Auch biochemisch spiegelten sich diese Befunde wider: die ALT-Aktivität war bei den mit Ethanol behandelten Mäusen erhöht. Adoleszentes Binge-Drinking geht experimentell und klinisch mit Transaminasen-Anstieg einher (Ojeda et al., 2015; Gallego-López et al., 2025; Binder et al., 2016), einer frühen biochemischen Veränderung bei alkoholischer Lebererkrankung (Cui et al., 2014). Die Persistenz erhöhter ALT trotz Abstinenz spricht für eine nachhaltige Schädigung.

Unterstützt werden unsere Ergebnisse durch die schwedische Registerstudie von Hagström et al. (2018). Diese zeigte bei über 43.000 jungen Männern über nahezu 40 Jahre einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum im Jugendalter und schweren Lebererkrankungen, mit dem höchsten Risiko ab zwei Getränken pro Tag und einem Trend bereits unterhalb vermeintlich sicherer Schwellen (Hagström et al., 2018). Binge-Drinking liegt deutlich über den aktuellen österreichischen Empfehlungen von ≤ 20 g pro Tag (24 g für Männer und 16 g für Frauen), entsprechend 0,5 L Bier oder 0,25 L leichter Wein (Sozialministerium AT). Der Body-Mass-Index unterschied sich kaum zwischen Konsumgruppen (Hagström et al., 2018), im Einklang mit unseren unveränderten Körpergewichten. Vetreno et al. (2021) fanden nach intermittierender juveniler Ethanolexposition bei Wistar-Ratten ebenfalls keine Unterschiede in Körper- und Lebergewicht. Im Gegensatz zu Hagström et al. (2018) argumentierten Askgaard et al. (2015), dass der aktuelle Alkoholkonsum ein stärkerer Risikofaktor für die Entwicklung einer alkoholischen Zirrhose sei als eine frühere Alkoholexposition. Unsere Ergebnisse stehen daher

im Gegensatz zu diesen Beobachtungen und legen nahe, dass bereits frühe Schäden langfristig bestehen bleiben.

Insgesamt stützen unsere Daten die Annahme, dass juveniles Binge-Drinking eine Vorschädigung in der Leber induziert, die im Alter auch natürlich auftretende entzündliche und fibrotische Veränderungen zusätzlich verstärkt. Früh im Lebensverlauf gesetzte Schäden scheinen also nicht nur kurzfristig, sondern auch langfristig die Lebergesundheit negativ zu beeinflussen, was auch nach langer Abstinenz sichtbar blieb.

5.3 Einfluss von juvenilem Binge-Drinking auf die altersassoziierte Veränderung der Darmbarriere im Mausmodell

Die Gabe von 6 g/kg KG Ethanol im Jugendalter, zweimal pro Woche über 4 Wochen, führte bei männlichen C57BL/6J Mäusen im Alter zur Störung der Darmbarriere.

Unsere Daten sprechen dafür, dass juveniler Alkoholkonsum eine langfristige Beeinträchtigung der intestinalen Barriere begünstigt, die bis ins Alter fortbesteht. Bereits frühe Arbeiten zeigten akute Schleimhautschäden nach Ethanol (Szabo et al., 1985). In unserem Modell fanden wir im Dünndarm eine signifikant erhöhte Sirius-Red-Signalstärke bei ethanolbehandelten Mäusen, was für vermehrte Kollagenablagerung spricht. Dies ist mit einer Typ-III-dominierten Frühfibrose oder einem reduzierten Kollagenabbau vereinbar und muss nicht von einem Anstieg der COL1A1-mRNA begleitet sein (Rieder et al., 2017). Im Einklang damit unterschied sich die COL1A1-Expression im Duodenum zwischen Kontroll- und Ethanolgruppe nicht. Während Sirius Red eingelagerte, langlebige Kollagenfasern (v. a. Typ I/III) auf Gewebeebene nachweist (López De Padilla et al., 2021), erfasst die qPCR für COL1A1 die momentane mRNA eines einzelnen Kollagen-Gens im Gesamthomogenat (Bustin et al., 2009). Ergänzende Analysen auf COL3A1 könnten die Befunde stützen und die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse erklären (Ballengee et al., 2019). Die Wahl des Duodenums war methodisch begründet, da bereits frühe Befunde gezeigt haben, dass Ethanol primär den oberen Dünndarm schädigt (Bode & Bode, 2003).

Auf Ebene der angeborenen Immunität quantifizierten wir im Pfortaderplasma die Konzentrationen von TLR2- und TLR4-Liganden. In der Ethanolgruppe waren dabei nur die TLR2-Liganden, nicht jedoch die TLR4-Liganden, signifikant erhöht. Das passt zu einer mikrobiell getriebenen Störung der Barrierefunktion, bei der bakterielle Produkte

Mustererkennungsrezeptoren (PRR) aktivieren und eine entzündliche Antwort fördern (Spencer et al., 2019). Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe wiesen im Alter erhöhte Endotoxinspiegel und eine Induktion TLR4-abhängiger Signalwege nach (Jin et al., 2020). Beim Menschen wurden unter jugendlichem Binge-Drinking erhöhte Endotoxine sowie TLR4/NF- κ B-Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen, oxidativem Stress und Lipidperoxidation beschrieben (Orio et al., 2017). Ähnliche Befunde zeigten Pascual et al. (2016) nach akuter Intoxikation bei jungen Erwachsenen. Interessanterweise beeinflusste das Geschlecht das Ausmaß der Entzündungsreaktion, teils mit stärkerer peripherer Aktivierung bei Frauen (Pascual et al., 2016), was zukünftig weitere Forschung erfordert.

Die selektive Erhöhung der TLR2-, nicht jedoch der TLR4-Liganden, lässt sich durch Kompartimentierung entlang des Darmtrakts, zeitliche Effekte oder Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung erklären und unterstreicht die Heterogenität PRR-vermittelter intestinaler Antworten (Price et al., 2018; Joeris et al., 2017). Insgesamt passt dies zu dem oben beschriebenen Mechanismus: Eine beeinträchtigte Barriere erleichtert die Translokation mikrobieller Moleküle und triggert PRR-abhängige Signalwege mit Zytokinfreisetzung (Spencer et al., 2019), was die verstärkte hepatische Entzündung in der Ethanolgruppe erklärt. Die Literatur über Alkoholkonsum und Mikrobiom stützt diesen Mechanismus. Bei Wistar-Ratten führte adoleszente Binge-Exposition zu vorübergehender und anhaltender Dysbiose sowie zu langfristigen Veränderungen enterischer Neurotransmitter (Vetreno et al., 2021). Eine Querschnittsstudie am Menschen, die sich auf Rauschtrinken ohne Alkoholkonsumstörung fokussierte, um potenzielle frühe Marker zu identifizieren, zeigte ebenfalls Veränderungen im Darmmikrobiom junger Rauschtrinker auf (Carbia et al., 2023). Segovia-Rodríguez et al. (2022) identifizierten auch alkoholbedingte Assoziationen im Darmmikrobiom von Universitätsstudenten. Ähnlich wie Carbia et al. (2023) wurden keine Unterschiede in der Alpha-Diversität festgestellt, es gab jedoch Unterschiede in der Beta-Diversität zwischen Personen mit gelegentlichem starkem Alkoholkonsum und Kontrollpersonen. Demgegenüber steht, dass moderate Ethanoldosen bei jungen Mäusen darmschützende Transkriptionsveränderungen induzierten (McMahan et al., 2021). Die unterschiedlichen Befunde sprechen für eine Dosis- und Musterabhängigkeit. Auch wenn Entzug in einigen Studien Barriereparameter teilweise normalisierte (Leclercq et al., 2014; Kirpich et al., 2017), berichteten andere über unvollständige Erholung des Mikrobioms und persistierende Effekte (Mutlu et al., 2012). Vor diesem Hintergrund ist bemerkenswert, dass

in unserem Langzeitsetting trotz jahrelanger Abstinenz histologische Zeichen eines anhaltenden Umbaus der extrazellulären Matrix (ECM) fortbestanden. Zusammengefasst deuten unsere Befunde darauf hin, dass juveniles Binge-Drinking eine langanhaltende Störung der Darm-Leber-Achse induziert, charakterisiert durch Barriere-Dysfunktion mit fokaler Kollagenablagerung im Duodenum, eine TLR2-Aktivierung und die daraus resultierende entzündliche Antwort in der Leber.

Um die zeitliche Dynamik zwischen Exposition und Altersendpunkten besser zu verstehen, sollten zusätzliche Zwischenzeitpunkte mit Messungen der ALT-Aktivität und der TLR-Aktivierung eingeplant werden. Die Diskrepanz zwischen Sirius-Red und COL1A1-qPCR spricht für eine erweiterte ECM-Charakterisierung sowie für Analysen der regionalen Heterogenität. Ergänzend dazu wären Messungen von Matrixmetalloproteinasen sinnvoll, um Kollagenabbau und Remodeling abzubilden. Offen bleiben zudem Geschlechtsunterschiede sowie Dosis- und Musterabhängigkeiten der Ethanolexposition.

6. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine kurzfristige, binge-ähnliche Ethanolexposition im Jugendalter bei männlichen C57BL/6J-Mäusen langfristige Spuren in Leber und Darm hinterlässt, die noch im hohen Alter nachweisbar sind. In der Leber äußerte sich die frühere Exposition in einer anhaltend stärkeren Infiltration von Neutrophilen, vermehrter Apoptose, erhöhter ALT-Aktivität und einer ausgeprägteren Kollagenablagerung. Damit verstärkt juveniler Alkoholkonsum im Alter die ohnehin altersassoziierten entzündlichen und fibrotischen Prozesse. Auf Darmebene deuten die fokale Kollagenzunahme sowie die erhöhten TLR2-Liganden auf eine mikrobiell vermittelte Barrierestörung mit nachgeschalteter Immunaktivierung hin und sprechen für eine dauerhaft veränderte Darm-Leber-Achse. Das eingesetzte Modell bildet ein klinisch relevantes Binge-Trinkmuster ab, erlaubt eine kontrollierte Langzeitbeobachtung bis ins hohe Mausalter und unterstreicht die Relevanz jugendlichen Rauschtrinkens als Risikofaktor für spätere Organfolgen.

Zur weiteren Einordnung sollten zusätzliche Zwischenmessungen (ALT, Entzündungs- und Apoptosemarker, TLR-Liganden) den zeitlichen Verlauf abbilden. Ergänzend sind funktionelle Permeabilitätsassays und Analysen von Tight-Junction-Proteinen sinnvoll, ebenso eine erweiterte Charakterisierung der extrazellulären Matrix, etwa durch zusätzliche Kollagen-Isoformen und Matrixmetalloproteinasen. Künftige Studien sollten zudem weibliche Tiere einbeziehen, um mögliche Geschlechtsunterschiede zu erfassen. Es ist zu beachten, dass die Mechanismen innerhalb der veränderten Darm-Leber-Achse mit den vorliegenden Daten nicht vollständig geklärt werden konnten und die Auswirkungen jugendlichen Binge-Drinkings im Alter auf weitere Organe noch systematisch untersucht werden müssen. Ein Abgleich mit humanen Biomarkern und Kohortendaten kann die Übertragbarkeit der Befunde stärken.

Insgesamt legt die vorliegende Arbeit nahe, dass bereits kurze binge-artige Ethanolepisoden im Jugendalter dauerhafte Spuren in Leber und Darm hinterlassen. Prävention und Aufklärung sollten diese Langzeitperspektive künftig stärker berücksichtigen, zumal Binge-Drinking bei jungen Menschen verbreitet ist und die empfohlenen Konsummengen deutlich überschreitet. Vor dem Hintergrund, dass Jugendliche und junge Erwachsene eine zentrale Zielgruppe der Suchtprävention sind, sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass juveniles Binge-Drinking unmittelbare und bleibende Schäden verursachen kann, die bislang häufig als reversibel eingeschätzt wurden.

Zusammenfassung

Der demografische Wandel ist durch einen zunehmenden Anteil älterer Menschen und einer Zunahme alkoholbedingter Gesundheitsschäden bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen gekennzeichnet. Während altersbedingte Umbauprozesse („Inflammaging“) in Leber und Darm gut beschrieben sind, ist unzureichend untersucht, ob früher Alkoholkonsum diese Veränderungen im späteren Leben beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von juvenilem Alkoholkonsum auf die altersassoziierten Leber- und Darmschäden im Mausmodell zu untersuchen.

Männliche C57BL/6J-Mäuse erhielten im Alter von drei bis vier Monaten achtmal einen sogenannten „Alkoholbinge“ (6 g/kg Ethanol), jeweils zweimal wöchentlich über vier Wochen. Die Kontrollgruppe bekam isokalorisch Maltodextrin. Die Nachbeobachtung erfolgte bis zum 24. Lebensmonat, wodurch sich Effekte früher Exposition auf Endpunkte im hohen Alter erfassen ließen. Anschließend wurden histologische, biochemische und immunologische Marker in Leber und Darm erhoben.

Im hohen Alter zeigten ethanol exponierte Tiere gegenüber Kontrollen eine anhaltend stärkere Infiltration von Neutrophilen in der Leber (Ly6G), vermehrte Apoptose (Cleaved Caspase-3), erhöhte ALT-Aktivität sowie ausgeprägtere Kollagenablagerungen (Sirius Red). Die hepatischen Triglyceridgehalte unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Im Duodenum ethanol behandelter Tiere wurde eine fokale Zunahme von Kollagen beobachtet (Sirius Red), ohne begleitenden Anstieg der Col1a1-mRNA. Im Pfortaderplasma zeigte sich eine selektive Erhöhung von Toll-like Rezeptor (TLR)2-Liganden (TLR4 nicht signifikant).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits kurzfristige binge-artige Ethanolexpositionen im Jugendalter im hohen Alter zu einer Verstärkung altersassoziierten entzündlicher und fibrotischer Veränderungen in Leber und Darm führen können. Die beobachteten Effekte sprechen für eine persistierende Beeinträchtigung der Darm-Leber-Achse, möglicherweise vermittelt durch mikrobielle Barrierestörungen und eine Aktivierung immunologischer Mustererkennungsrezeptoren (PRR). Diese Befunde unterstreichen die potenziell langfristigen Konsequenzen jugendlichen Alkoholkonsums für die Organalterung. Zukünftige Studien sollten die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Veränderungen weiter untersuchen und deren Übertragbarkeit auf den Menschen evaluieren.

Summary

The demographic shift is characterized by an increasing proportion of elderly individuals and a rise in alcohol-related health damage among adolescents and young adults. While age-related remodeling processes (“inflammaging”) in the liver and intestine are well described, it remains insufficiently studied whether early alcohol consumption influences these changes later in life. The aim of the present study was to investigate the effects of juvenile alcohol consumption on age-associated liver and intestinal damage in a mouse model.

Male C57BL/6J mice received eight “alcohol binges” (6 g/kg ethanol) at the age of three to four months, twice weekly over four weeks. The control group received isocaloric maltodextrin. Follow-up continued until 24 months of age, allowing assessment of the effects of early exposure on endpoints in old age. Subsequently, histological, biochemical, and immunological markers in liver and intestine were analyzed.

In old age, ethanol-exposed animals showed a persistently stronger infiltration of neutrophils in the liver (Ly6G), increased apoptosis (cleaved Caspase-3), elevated ALT activity, and more pronounced collagen deposition (Sirius Red) compared to controls. Hepatic triglyceride levels did not differ between groups. In the duodenum of ethanol-treated animals, a focal increase in collagen was observed (Sirius Red) without a concomitant rise in Col1a1 mRNA. Portal vein plasma showed a selective increase in Toll-like receptor (TLR) 2 ligands (TLR4 was not significantly altered).

These findings suggest that even short-term, binge-like ethanol exposure during adolescence may exacerbate age-associated inflammatory and fibrotic changes in the liver in later life. The observed effects point to a persistent impairment of the gut-liver axis, potentially mediated by microbial barrier disruption and the activation of immune pattern recognition receptors (PRRs). These results highlight the potential long-term consequences of adolescent alcohol consumption for organ aging. Future studies should further investigate the underlying mechanisms of these changes and assess their relevance for humans.

Literaturverzeichnis

- Akram, W., Najmi, A. K., & Haque, S. E. (2024). Levocabastine ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in Swiss albino mice: Modulation of Nrf2, NF- κ B p65, cleaved caspase-3 and TGF- β signaling molecules. *Journal of Molecular Histology*, 56(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s10735-024-10286-2>
- Albano, E. (2008). Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.09.004>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Askgaard, G., Grønbaek, M., Kjær, M. S., Tjønneland, A., & Tolstrup, J. S. (2015). Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: A prospective cohort study. *Journal of Hepatology*, 62(5), 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.005>
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Ballengee, C. R., Stidham, R. W., Liu, C., Kim, M.-O., Prince, J., Mondal, K., Baldassano, R., Dubinsky, M., Markowitz, J., Leleiko, N., Hyams, J., Denson, L., & Kugathasan, S. (2019). Association between plasma level of collagen type III alpha 1 chain and development of strictures in pediatric patients with Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(9), 1799–1806. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.008>
- Baraona, E., Abittan, C. S., Dohmen, K., Moretti, M., Pozzato, G., Chayes, Z. W., Schaefer, C., & Lieber, C. S. (2001). Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(4), 502–507. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02242.x>
- Bellamkonda, R., Mahalingam, S., Ethiraj, O., Perumal, S. K., Arumugam, M. K., Knoell, D. L., Fisher, K. W., Casey, C. A., Kharbanda, K. K., & Rasineni, K. (2025). Effect of aging on the development and progression of alcohol-associated liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 49(7), 1412–1423. <https://doi.org/10.1111/acer.70086>
- Bhutda, S., Surve, M. V., Anil, A., Kamath, K., Singh, N., Modi, D., & Banerjee, A. (2017). Histochemical staining of collagen and identification of its subtypes by Picrosirius Red dye in mouse reproductive tissues. *Bio-protocol*, 7(21), e2592. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2592>
- Binder, C., Knibbe, K., Kreissl, A., Repa, A., Thanhaeuser, M., Greber-Platzer, S., Berger, A., Jilma, B., & Haiden, N. (2016). Does acute alcohol intoxication cause transaminase elevations in children and adolescents? *Alcohol*, 51, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.12.001>

Bode, C., & Bode, J. C. (2003). Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(4), 575–592. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00034-9)

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brandt, A., Baumann, A., Hernández-Arriaga, A., Jung, F., Nier, A., Staltner, R., Rajcic, D., Schmeer, C., Witte, O. W., Wessner, B., Franzke, B., Wagner, K.-H., Camarinha-Silva, A., & Bergheim, I. (2022). Impairments of intestinal arginine and NO metabolisms trigger aging-associated intestinal barrier dysfunction and “inflammaging.” *Redox Biology*, 58, 102528. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102528>

Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz. (n. d.). *Alkohol und mögliche Folgen* [Informationsbroschüre]. Wien: Autor. Abgerufen am 27. September 2025, von <https://www.sozialministerium.gv.at/Themen/Gesundheit/Drogen-und-Sucht/Alkohol.html>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Carbia, C., Bastiaanssen, T. F. S., Iannone, L. F., García-Cabrero, R., Boscaini, S., Berding, K., Strain, C. R., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2023). The microbiome–gut–brain axis regulates social cognition and craving in young binge drinkers. *EBioMedicine*, 89, 104442. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104442>

Chung, B. S., Yang, K., Park, C., & Ryu, T. (2025). Prolonged intestinal ethanol absorption and oxidative stress: Revisiting the gut-liver axis in alcohol-associated disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5442. <https://doi.org/10.3390/ijms26125442>

Cui, Y., Ye, Q., Wang, H., Li, Y., Xia, X., Yao, W., & Qian, H. (2014). Aloiin protects against chronic alcoholic liver injury via attenuating lipid accumulation, oxidative stress and inflammation in mice. *Archives of Pharmacological Research*, 37, 1624–1633. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0370-0>

Delire, B., Starkel, P., & Leclercq, I. (2015). Animal models for fibrotic liver diseases: What we have, what we need, and what is under development. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3(1), 53–66. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00035>

Ekström, G., & Ingelman-Sundberg, M. (1989). Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochemical Pharmacology*, 38(8), 1313–1319. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90338-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90338-9)

Erol, A., & Karpyak, V. M. (2015). Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug and Alcohol Dependence*, 156, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.08.023>

Farrell, G., Schattenberg, J. M., Leclercq, I., Yeh, M. M., Goldin, R., Teoh, N., & Schuppan, D. (2019). Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: Toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 69(5), 2241–2257. <https://doi.org/10.1002/hep.30333>

Felder-Puig, R., Teufl, L., & Winkler, R. (2024). *Konsum von Alkohol, Nikotinprodukten, verwandten Erzeugnissen und Cannabis: HBSC-Factsheet 06 aus Erhebung 2021/22*. Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK). <https://jasmin.goeg.at/id/eprint/3828/>

Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology*, 1180, 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3

Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA methylation clocks in aging: Categories, causes, and consequences. *Molecular Cell*, 71(6), 882–895. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>

Flurkey, K., & Currer, J. M. (2004). Pitfalls of animal model systems in ageing research. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 18(3), 407–421. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2004.02.001>

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

Fontana, L., Zhao, E., Amir, M., Dong, H., Tanaka, K., & Czaja, M. J. (2013). Aging promotes the development of diet-induced murine steatohepatitis but not steatosis. *Hepatology*, 57(3), 995–1004. <https://doi.org/10.1002/hep.26099>

Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(Suppl_1), S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>

Gallego-López, M. D. C., Nogales, F., Romero-Herrera, I., Santana-Garrido, Á., Carreras, O., & Ojeda, M. L. (2025). Adolescent binge drinking disrupts hepatic lipid homeostasis, leading to steatosis in rats: Protective role of folic acid in cholesterol and fatty acid balance. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology*, 329(2), G276–G290. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00129.2025>

GBD 2021 Demographics Collaborators. (2024). Global age-sex-specific mortality, life expectancy, and population estimates in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1950–2021, and the impact of the COVID-19 pandemic: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 403(10440), 1989–2056. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00476-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00476-8)

GBD 2021 Forecasting Collaborators. (2024). Burden of disease scenarios for 204 countries and territories, 2022–2050: A forecasting analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 403(10440), 2204–2256. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00685-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00685-8)

Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2), bvz039. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>

Guengerich, F. P., Kim, D. H., & Iwasaki, M. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), 168–179. <https://doi.org/10.1021/tx00020a008>

Hagström, H., Hemmingsson, T., Discacciati, A., & Andreasson, A. (2018). Alcohol consumption in late adolescence is associated with an increased risk of severe liver disease later in life. *Journal of Hepatology*, 68(3), 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.019>

Hartmann, P., Seebauer, C. T., & Schnabl, B. (2015). Alcoholic liver disease: The gut microbiome and liver cross talk. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(5), 763–775. <https://doi.org/10.1111/acer.12704>

Hege, M., Jung, F., Sellmann, C., Jin, C., Ziegenhardt, D., Hellerbrand, C., Bergheim, I. (2018). An iso- α -acid-rich extract from hops (*Humulus lupulus*) attenuates acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *Nutrition*, 45, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.07.010>

Idelfonso-García, O. G., Alarcón-Sánchez, B. R., Guerrero-Escalera, D., López-Hernández, N. A., Pérez-Hernández, J. L., Pacheco-Rivera, R., Serrano-Luna, J., Resendis-Antonio, O., Muciño-Olmos, E. A., Aparicio-Bautista, D. I., Basurto-Islas, G., Baltiérrez-Hoyos, R., Vásquez-Garzón, V. R., Villa-Treviño, S., Muriel, P., Serrano, H., Pérez-Carreón, J. I., & Arellanes-Robledo, J. (2024). Nucleoredoxin redox interactions are sensitized by aging and potentiated by chronic alcohol consumption in the mouse liver. *Antioxidants*, 13(3), 257. <https://doi.org/10.3390/antiox13030257>

Jiang, Y., Zhang, T., Kusumanchi, P., Han, S., Yang, Z., & Liangpunsakul, S. (2020). Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease. *Biomedicines*, 8(3), 50. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8030050>

Jin, C. J., Baumann, A., Brandt, A., Engstler, A. J., Nier, A., Hege, M., Schmeer, C., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Witte, O. W., & Bergheim, I. (2020). Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(4), G736–G747. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00345.2018>

Joeris, T., Müller-Luda, K., Agace, W. W., & Mowat, A. M. (2017). Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunology*, 10, 845–864. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.22>

Jung, F., Burger, K., Staltner, R., Brandt, A., Mueller, S., & Bergheim, I. (2021). Markers of intestinal permeability are rapidly improved by alcohol withdrawal in patients with alcohol-related liver disease. *Nutrients*, 13(5), 1659. <https://doi.org/10.3390/nu13051659>

Jung, F., Sánchez, V., Brandt, A., & Bergheim, I. (2023). Alcohol-related liver disease: Also a question of what you drink? *Exploration of Digestive Diseases*, 2(3), 118–132. <https://doi.org/10.37349/edd.2023.00022>

Kirpich, I. A., McClain, C. J., Vatsalya, V., et al. (2017). Liver injury and endotoxemia in male and female alcohol-dependent individuals admitted to an alcohol treatment program. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(4), 747–757. <https://doi.org/10.1111/acer.13346>

Lackner, C., & Tiniakos, D. (2019). Fibrosis and alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology*, 70(2), 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.003>

Landmann, M., Sellmann, C., Engstler, A. J., Ziegenhardt, D., Jung, F., Brombach, C., ... Bergheim, I. (2017). Hops (*Humulus lupulus*) content in beer modulates effects of beer on the liver after acute ingestion in female mice. *Alcohol and Alcoholism*, 52(1), 48–55. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw060>

Leclercq, S., Matamoros, S., Cani, P. D., et al. (2014). Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), E4485–E4493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415174111>

Levine, B. S., Caplan, Y. H., & Jones, A. W. (2020). Alcohol. In B. S. Levine, Y. H. Caplan, & A. W. Jones (Eds.), *Principles of forensic toxicology* (287–316). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_19

López De Padilla, C. M., Coenen, M. J., Tovar, A., De la Vega, R. E., Evans, C. H., & Müller, S. A. (2021). Picrosirius red staining: Revisiting its application to the qualitative and quantitative assessment of collagen type I and type III in tendon. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 69(10), 633–643. <https://doi.org/10.1369/00221554211046777>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

McMahan, R. H., Najarro, K. M., Mullen, J. E., Paul, M. T., Orlicky, D. J., Hulsebus, H. J., & Kovacs, E. J. (2021). A novel murine model of multi-day moderate ethanol exposure reveals increased intestinal dysfunction and liver inflammation with age. *Immunity & Ageing*, 18, 37. <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00247-8>

Michalak, A., Lach, T., & Cichoż-Lach, H. (2021). Oxidative stress—A key player in the course of alcohol-related liver disease. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3011. <https://doi.org/10.3390/jcm10143011>

Miyata, T., & Nagy, L. E. (2020). Programmed cell death in alcohol-associated liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 26(4), 618–625. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0142>

Molina, P. E., Gardner, J. D., Souza-Smith, F. M., & Whitaker, A. M. (2014). Alcohol abuse: Critical pathophysiological processes and contribution to disease burden. *Physiology*, 29(3), 203–215. <https://doi.org/10.1152/physiol.00055.2013>

Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics* (7. Aufl.). Springer Berlin. ISBN 978-3-642-34635-4.

Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., et al. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), G966–G978. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00380.2011>

Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(4), 267–285. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2025). *Understanding binge drinking*. Abgerufen am 11. August 2025, von <https://www.niaaa.nih.gov/publications/brochures-and-fact-sheets/binge-drinking>

Nelson, G. H., Kinard, F. W., & Hay, M. G. (1957). Rate of metabolism of ethanol in the mouse. *American Journal of Physiology*, 190(1), 169–171. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1957.190.1.169>

Ojeda, M. L., Rua, R. M., Murillo, M. L., Carreras, O., & Nogales, F. (2015). Binge drinking during adolescence disrupts Se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39, 818–826. <https://doi.org/10.1111/acer.12707>

Orio, L., Antón, M., Rodríguez-Rojo, I. C., Correas, Á., García-Bueno, B., Corral, M., Rodríguez de Fonseca, F., García-Moreno, L. M., Maestú, F., & Cadaveira, F. (2017). Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: Neuropsychological correlations in women. *Addiction Biology*, 23(5), 1130–1144. <https://doi.org/10.1111/adb.12543>

Osna, N. A., & Kharbanda, K. K. (2016). Multi-organ alcohol-related damage: Mechanisms and treatment. *Biomolecules*, 6(2), 20. <https://doi.org/10.3390/biom6020020>

Osna, N. A., Rasineni, K., Ganesan, M., Donohue, T. M., Jr., & Kharbanda, K. K. (2022). Pathogenesis of alcohol-associated liver disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 12(5), 1492–1513. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.05.004>

Pál, L., Muhollari, T., Bujdosó, O., Baranyai, E., Nagy, A., Árnay, E., Ádány, R., Sándor, J., McKee, M., & Szűcs, S. (2020). Heavy metal contamination in recorded and unrecorded spirits:

Should we worry? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 116, 104723. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104723>

Pascual, M., Montesinos, J., Marcos, M., Torres, J. L., Costa-Alba, P., Garcia-Garcia, F., Laso, F. J., & Guerri, C. (2016). Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. *Addiction Biology*, 22(6), 1829–1841. <https://doi.org/10.1111/adb.12461>

Penrice, D. D., Jalan-Sakrikar, N., Jurk, D., Passos, J. F., & Simonetto, D. A. (2024). Telomere dysfunction in chronic liver disease: The link from aging. *Hepatology*, 80(3), 951–964. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000426>

Pollenus, E., Malengier-Devlies, B., Vandermosten, L., Pham, T.-T., Mitera, T., Possemiers, H., Boon, L., Opdenakker, G., Matthys, P., & Van den Steen, P. E. (2019). Limitations of neutrophil depletion by anti-Ly6G antibodies in two heterogenic immunological models. *Immunology Letters*, 212, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.006>

Price, A. E., Shamardani, K., Lugo, K. A., Deguine, J., Roberts, A. W., Lee, B. L., & Barton, G. M. (2018). A map of Toll-like receptor expression in the intestinal epithelium reveals distinct spatial, cell type-specific, and temporal patterns. *Immunity*, 49(3), 560–575.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.016>

Ramirez, T., Li, Y.-M., Yin, S., Xu, M.-J., Feng, D., Zhou, Z., Zang, M., Mukhopadhyay, P., Varga, Z. V., Pacher, P., Gao, B., & Wang, H. (2017). Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by downregulating Sirtuin 1 expression. *Journal of Hepatology*, 81(5), 1123–1135. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.004>

Rao, R. K. (2008). Acetaldehyde-induced barrier disruption and paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 447, pp. 171–183). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-242-7_13

Rehm, J., Probst, C., Shield, K., & Shuper, P. (2017). Does alcohol use have a causal effect on HIV incidence and disease progression? A review of the literature and a modeling strategy for quantifying the effect. *Population Health Metrics*, 15, 4. <https://doi.org/10.1186/s12963-017-0121-9>

Ren, R., Wang, Z., Wu, M., & Wang, H. (2020). Emerging roles of SIRT1 in alcoholic liver disease. *International Journal of Biological Sciences*, 16(16), 3174–3183. <https://doi.org/10.7150/ijbs.49535>

Rieder, F., Fiocchi, C., & Rogler, G. (2017). Mechanisms, management, and treatment of fibrosis in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 152(2), 340–350.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.047>

Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>

Sabharwal, S., Wilson, H., Reilly, P., & Gupte, C. M. (2015). Heterogeneity of the definition of elderly age in current orthopaedic research. *SpringerPlus*, 4, 516. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1307-x>

Schmucker, D. L. (2005). Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease. *Experimental Gerontology*, 40(8–9), 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.009>

Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Pellegrini, C., Blandizzi, C., Dolfi, A., & Bernardini, N. (2015). Histochemical detection of collagen fibers by Sirius Red/Fast Green is more sensitive than van Gieson or Sirius Red alone in normal and inflamed rat colon. *PLOS ONE*, 10(12), e0144630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144630>

Segovia-Rodríguez, L., Echeverry-Alzate, V., Rincón-Pérez, I., Calleja-Conde, J., Bühler, K. M., Giné, E., Albert, J., Hinojosa, J. A., Huertas, E., Gómez-Gallego, F., Bressa, C., Rodríguez de Fonseca, F., & López-Moreno, J. A. (2022). Gut microbiota and voluntary alcohol consumption. *Translational Psychiatry*, 12(1), 146. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01920-2>

Shemtov, S. J., Molina, A. J., & Deitch, E. A. (2022). Aging and intestinal barrier function: An understudied problem with clinical implications. *The FEBS Journal*, 289(15), 4224–4245. <https://doi.org/10.1111/febs.16558>

Spencer, S. P., Fragiadakis, G. K., & Sonnenburg, J. L. (2019). Pursuing human-relevant gut microbiota–immune interactions. *Immunity*, 51, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.002>

Starkel, P., & Leclercq, I. A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 25(2), 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.004>

STATISTIK AUSTRIA. (2020). *Österreichische Gesundheitsbefragung 2019*. Abgerufen am 05.08.2025, von https://www.statistik.at/fileadmin/user_upload/Oesterreichische-Gesundheitsbefragung2019-Annex.pdf

STATISTIK AUSTRIA. (2024). *Bevölkerungsprognose 2024, Hauptvariante*. Statistik Austria. Abgerufen am 05.08.2025, von https://www.statistik.at/atlas/bev_prognose/#!y=2060

Statista Research Department. (2025). *Altersstruktur in Österreich von 2015 bis 2025*. Statista. Abgerufen am 05.08.2025, von <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/217431/umfrage/altersstruktur-in-oesterreich/>

Szabo, G., & Bala, S. (2010). Alcoholic liver disease and the gut–liver axis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(11), 1321–1329. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i11.1321>

Szabo, S., Trier, J. S., Brown, A., & Schnoor, J. (1985). Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology*, 88(1 Pt 2), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(85\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(85)80176-1)

Szeto, H. H. (2006). Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *AAPS Journal*, 8(3), E521–E531. <https://doi.org/10.1208/aapsj080362>

Tajiri, K., & Shimizu, Y. (2013). Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World Journal of Gastroenterology*, 19(46), 8459–8467. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8459>

Thomes, P. G., Rasineni, K., Saraswathi, V., Kharbanda, K. K., Clemens, D. L., Sweeney, S. A., Kubik, J. L., Donohue, T. M., Jr., & Casey, C. A. (2021). Natural recovery by the liver and other organs after chronic alcohol use. *Alcohol Research: Current Reviews*, 41(1), 05. <https://doi.org/10.35946/arcr.v41.1.05>

Thomes, P. G., Rasineni, K., Yang, L., Donohue, T. M., Jr., Kubik, J. L., McNiven, M. A., & Casey, C. A. (2019). Ethanol withdrawal mitigates fatty liver by normalizing lipid catabolism. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology*, 316(4), G509–G518. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00376.2018>

Tran, L., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2013). Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(9), 1045–1056. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt106>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>

United Nations Population Fund. (o.J.). *Ageing*. Abgerufen am 05.08.2025, von <https://www.unfpa.org/ageing>

Untersmayr, E., Brandt, A., Koidl, L. & Bergheim, I. (2022). The Intestinal Barrier Dysfunction as Driving Factor of Inflammaging. *Nutrients*, 14(5), 949. <https://doi.org/10.3390/nu14050949>

Ventura-Cots, M., Watts, A. E., & Bataller, R. (2017). Binge drinking as a risk factor for advanced alcoholic liver disease. *Liver International*, 37(8), 1281–1283. <https://doi.org/10.1111/liv.13482>

Vetreno, R. P., Massey, V., & Crews, F. T. (2021). Long-lasting microbial dysbiosis and altered enteric neurotransmitters in adult rats following adolescent binge ethanol exposure. *Addiction Biology*, 26(1), e12869. <https://doi.org/10.1111/adb.12869>

Wagnerberger, S., Fiederlein, L., Kanuri, G., Stahl, C., Millonig, G., Mueller, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2013). Sex-specific differences in the development of acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *Alcohol and Alcoholism*, 48(6), 648–656. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agt138>

Walker, E. M., Slisarenko, N., Gerrets, G. L., Kissinger, P. J., Didier, E. S., Kuroda, M. J., Veazey, R. S., Jazwinski, S.M. & Rout, N. (2019). Inflammaging phenotype in rhesus macaques is

associated with a decline in epithelial barrier-protective functions and increased pro-inflammatory function in CD161-expressing cells. *GeroScience*, 41(6), 739–757. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00099-7>

Wang, L., Fouts, D. E., Stärkel, P., Hartmann, P., Chen, P., Llorente, C., DePew, J., Moncera, K., Ho, S. B., Brenner, D. A., Hooper, L. V. & Schnabl, B. (2016). Intestinal REG3 lectins protect against alcoholic steatohepatitis by reducing mucosa-associated microbiota and preventing bacterial translocation. *Cell Host & Microbe*, 19(2), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.003>

Wang, X., Lu, Y., Xie, B., & Cederbaum, A. I. (2009). Chronic ethanol feeding potentiates Fas Jo2-induced hepatotoxicity: Role of CYP2E1, TNF- α , and activation of JNK and p38 MAP kinase. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 518–528. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.021>

Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., & Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Science*, 108(4), 563–569. <https://doi.org/10.1111/cas.13184>

Windle, M., Spear, L. P., Fuligni, A. J., Brown, J. D., Gunner, M., Brown, B. B., et al. (2008). Transitions into underage and problem drinking: Developmental processes and mechanisms between 10 and 15 years of age. *Pediatrics*, 121(Suppl. 4), S273–S289. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-2243C>

World Health Organization. (2007). *Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption: Second report* (WHO Technical Report Series, No. 944). World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241209441>

World Health Organization. (2018). *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>

World Health Organization. (2024a). *Ageing and health*. Abgerufen am 05.08.2025, von <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>

World Health Organization. (2024b). *Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders*. World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/377960/9789240096745-eng.pdf?sequence=1>

World Health Organization Regional Office for Europe. (2024). *Alcohol, e-cigarettes, cannabis: Concerning trends in adolescent substance use, shows new WHO/Europe report*. <https://www.who.int/europe/news-room/25-04-2024-alcohol--e-cigarettes--cannabis--concerning-trends-in-adolescent-substance-use--shows-new-who-europe-report>

Wu, D., & Cederbaum, A. I. (1999). Ethanol-induced apoptosis to stable HepG2 cell lines expressing human cytochrome P-4502E1. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(1), 67–76. PMID: 10029205.

Yan, A. W., Fouts, D. E., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., et al. (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*, 53(1), 96–105. <https://doi.org/10.1002/hep.24018>

Yang, J., Wang, H., Lin, X., Liu, J., Feng, Y., Bai, Y., Liang, H., Hu, T., Wu, Z., Lai, J., Liu, J., Zou, Y., Wei, S., & Yan, P. (2024). Gut microbiota dysbiosis induced by alcohol exposure in pubertal and adult mice. *mSystems*, 9(12), e0136624. <https://doi.org/10.1128/msystems.01366-24>

Yao, Y.-Q., Cao, Q.-Y., & Li, Z. (2025). Delaying liver aging: Analysis of structural and functional alterations. *World Journal of Gastroenterology*, 31(15), 103773. <https://doi.org/10.3748/wjg.v31.i15.103773>

Ye, D., Guo, S., Al-Sadi, R., & Ma, T. Y. (2011). MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*, 141(4), 1323–1333. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.005>

Yeo, Y. H., He, X., Ting, P.-S., Zu, J., Almario, C. V., Spiegel, B. M. R., & Ji, F. (2022). Evaluation of trends in alcohol use disorder–related mortality in the US before and during the COVID-19 pandemic. *JAMA Network Open*, 5(5), e2210259. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.10259>

Zakhari, S., & Li, T. K. (2007). Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*, 46(6), 2032–2039. <https://doi.org/10.1002/hep.22010>

Zhou, Z., Sun, X., & Kang, Y. J. (2001). Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *The American Journal of Pathology*, 159(1), 329–338. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61699-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61699-9)

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in der vorliegenden Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werde, ersuch ich um Meldung bei mir.

Zur Korrektur von grammatikalischen und orthografischen Fehlern wurde beim Verfassen der vorliegenden Masterarbeit Grammarly verwendet. Mit ChatGPT wurden stilistische Elemente einiger Formulierungen in meinem Text verbessert. Die englische Zusammenfassung wurde mit Hilfe von DeepL auf Basis der deutschen Version erstellt und anschließend eigenständig überprüft und überarbeitet.

Anhang

Tabelle 6: Zusammensetzung Tris-EDTA-Puffer

Substanz	Menge (pro Liter)
Tris Base	1,21 g
EDTA	0,37 g
dH ₂ O	1 L
Tween®20	500 µL

pH-Wert von 9 mit HCl oder NaOH eingestellt

Tabelle 7: Zusammensetzung Mono-Natriumcitrat

Substanz	Menge (pro Liter)
Na-Citrat	2,1411 g
dH ₂ O	1 L

pH-Wert von 6 mit HCl oder NaOH eingestellt

Tabelle 8: Zusammensetzung 10x PBS

Substanz	Menge (pro Liter)
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	7,62 g
KH ₂ PO ₄	0,77 g

pH-Wert von 7,4 mit HCl oder NaOH eingestellt

1x PBS: 100 mL 10x PBS + 900 mL dH₂O

2x PBS: 200 mL 10x PBS + 800 mL dH₂O

Tabelle 9: Zusammensetzung TBE-Puffer

Substanz	Menge (pro Liter)
5x TBE	200 mL
dH ₂ O	800 mL

Tabelle 10: Zusammensetzung PBST

Substanz	Menge (pro Liter)
10x PBS	100 mL
dH ₂ O	900 mL
Tween®20	500

Tabelle 11: Verwendete Verdünnungsfaktoren und Extraktionspuffer der Methoden

Methode	Verdünnungsfaktor	Extraktionspuffer
Triglycerid-Extraktion	1:30	2x PBS