

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktorin: Prof. Dr. med. Grietje Beck)

Etablierung und Charakterisierung eines murinen Cecal Slurry Sepsis-
Modells

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Laura Sophie Schäfer

aus
Kandel
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Charalambos Tsagogiorgas

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 Definition der Sepsis	2
1.2 Epidemiologie der Sepsis.....	4
1.3 Ätiologie der mikrobiellen Sepsis	4
1.4 Pathophysiologie der Sepsis.....	5
1.5 Diagnostik	6
1.6 Klinik der Sepsis.....	9
1.7 Therapie der Sepsis	10
1.8 Zytokine.....	14
1.9 Sepsis Modelle.....	14
1.10 Fragestellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	17
2.2 CS-Präparation	17
2.3 „Murine Sepsis Score“	18
2.4 Versuchsprotokoll.....	20
2.5 Leukozytenzahlbestimmung.....	22
2.6 Plasmaparameter.....	23
2.7 Bakterienlast	23
2.8 Zytokine.....	24
2.9 Körpertemperatur	25
2.10 Statistische Auswertung.....	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 Bakterienlast im CS.....	26

3.2	Versuchsteil I - Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs.....	26
3.3	Versuchsteil II - Charakterisierung des Modells.....	31
3.4	Zusammenschau klinisch relevanter Variablen in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose.....	51
4	DISKUSSION.....	52
4.1	CS vs. CLP.....	53
4.2	CS-Herstellung.....	55
4.3	Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs.....	55
4.4	Charakterisierung des Modells.....	57
4.5	Vergleich mit der humanen Sepsis.....	64
4.6	Limitationen eines murinen Sepsis-Modells.....	66
4.7	Limitationen unseres CS-Modells.....	67
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
7	TABELLARISCHER ANHANG.....	78
7.1	Chemikalien.....	78
7.2	Geräte und Zubehör.....	78
7.2.1	Verbrauchsmaterial.....	78
7.2.2	Geräte.....	79
8	LEBENS LAUF.....	81
9	DANKSAGUNG.....	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
CLP	Cecal-Ligation-and-Puncture
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CS	Cecal Slurry
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAP	mean arterial pressure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSS	Murine Sepsis Score
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCT	Procalcitonin
PET-CT	Positronenemissions-Computertomographie
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	Surviving Sepsis Campaign
s.c.	subkutan
TNF	Tumornekrosefaktor
TF	Tissue Factor
UMM	Universitätsmedizin Mannheim

1 EINLEITUNG

1.1 Definition der Sepsis

Bereits 1991 wurde eine allgemein gültige Definition der Sepsis beruhend auf dem Konzept des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) festgelegt (Levy et al., 2003). Es wurde zwischen Sepsis, einer schweren Sepsis und einem septischen Schock unterschieden. Für die Sepsis mussten zwei von vier SIRS-Kriterien vorliegen. Diese setzten sich zusammen aus Hypo- (unter 36°C) oder Hyperthermie (über 38°C), Tachykardie mit einer Herzfrequenz von mindestens 90 Schlägen pro Minute, Tachypnoe mit einer Atemfrequenz ab 20 Atemzügen in der Minute oder einem arteriellen Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Partialdruck von unter 32 mmHg und einer Leukozytose (min. 12000/μl) oder einer Leukopenie mit höchstens 4000 Leukozyten/μl und/oder einer Linksverschiebung der Granulozyten über 10% (Levy et al., 2003). Eine schwere Sepsis wurde definiert als Sepsis mit zusätzlich einhergehender Organdysfunktion, ein septischer Schock mit flüssigkeitsrefraktärer Hypotonie mit konsekutiver Katecholaminpflichtigkeit. 2001 wurde diese Definition erstmalig überarbeitet und weitere Kriterien zu den vier bereits bestehenden hinzugefügt (Levy et al., 2003).

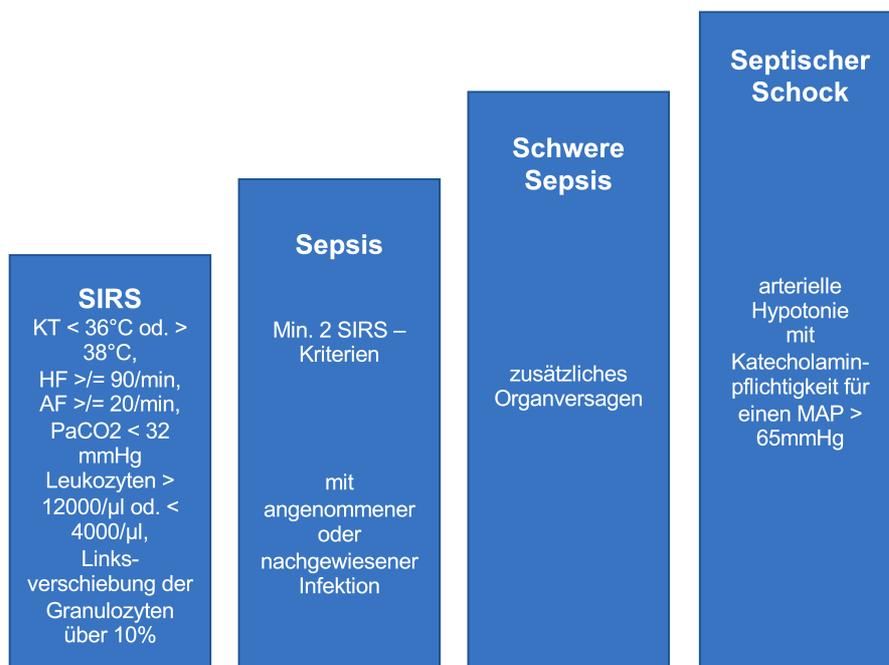


Abbildung 1: Definition der Sepsis 1991 nach Levy et al., 2003

Aufgrund mehrerer Kritikpunkte wurde der nach den ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien definierte ältere Begriff der Sepsis im Jahr 2016 neu definiert und in den aktuellsten Guidelines weiterhin wie 2016 definiert aufgegriffen (Bone et al., 1992; Evans et al., 2021a; Singer et al., 2016). Eine Sepsis entspricht nun einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion, ausgelöst durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine mutmaßliche Infektion (Singer et al., 2016). Der septische Schock stellt eine Maximalform der Sepsis dar und geht mit einer erhöhten Mortalität einher (Rhodes et al., 2017). Der septische Schock beinhaltet nach der neuen Definition eine Laktat-Konzentration im Blut über 2 mmol/l (>18 mg/dL) und eine notwendige Katecholamintherapie bei arterieller Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie (Rhodes et al., 2017). Der Begriff SIRS wird heute nicht mehr genutzt, da das Vorliegen einer Organdysfunktion für die Sepsis nun unabdingbar ist und sie so von einer unkomplizierten Infektion ohne Organdysfunktion unterschieden werden soll. 2021 wurden die neusten Empfehlungen zur Sepsis und dem septischen Schock veröffentlicht (Evans et al., 2021a).

Tabelle 1: SOFA-Score angelehnt an die Sepsis-3-Definition nach Singer et al., 2016

SOFA Score	1	2	3	4
Atmung, PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	<400	<300	<200 (mit resp. Unterstützung)	<100 (mit resp. Unterstützung)
Koagulation, Thrombozyten x10 ³ /mm ³	<150	<100	<50	<20
Leber, Bilirubin, mg/dl	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>20
Kardiovaskuläres System, Hypotension	MAD <70mmHg	Dopamin ≤5µg/kg/min oder Dobutamin	Dopamin >5µg/kg/min oder Epinephrin ≤0,1µg/kg/min oder Norepinephrin ≤0,1µg/kg/min	Dopamin >15µg/kg/min oder Epinephrin ≤0,1µg/kg/min oder Norepinephrin ≤0,1µg/kg/min
Zentrales Nervensystem, Glasgow Coma Scale	13-14	12-10	6-9	≤6
Niere, Kreatinin, mg/dl oder Urinproduktion	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 oder <500ml/Tag	>5 oder <200ml/Tag

Zur Diagnosestellung und Prognoseabschätzung wird der SOFA-Score (**Tabelle 1**) verwendet, der die Dysfunktion verschiedener Organsysteme beschreibt. Danach kann bei 6 Organsystemen mit bis zu 4 Punktwerten der additive Score zwischen 0 und 24 betragen. Bei einem Punktwert von größer gleich zwei besteht bei vorliegender oder mutmaßlicher Infektion eine Sepsis und ein Mortalitätsrisiko von über 10% (Singer et al., 2016; Vincent et al., 1996) .

1.2 Epidemiologie der Sepsis

Die aktuellsten Daten zur Epidemiologie der Sepsis nach der neuen Definition kommen in Deutschland aus der INSEP-Studie (SepNet Critical Care Trials, 2016): Durchschnittlich lag bei Zugrundelegung der Sepsis-3-Definition die Intensiv- bzw. Gesamtkrankenhausletalität bei 44,3% bzw. 50,9%, die Intensivmortalität der Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock betrug laut der INSEP-Studie 34,4% (SepNet Critical Care Trials, 2016). Die DRG-Statistik der Krankenhäuser in Deutschland zeigte dabei jährlich einen Anstieg der ICD-Codes für Sepsis um 5,7% zwischen 2007 und 2013 von 200.535 auf 279.530 Fälle (Fleischmann et al., 2016; SepNet Critical Care Trials, 2016). Außerdem stieg der Anteil an Patienten mit schwerer Sepsis (Fleischmann et al., 2016; SepNet Critical Care Trials, 2016). Deutschlandweit zeigte Fleischmann eine Gesamtkrankenhausmortalität der Sepsis von 17% und der schweren Sepsis von 24% (Fleischmann et al., 2016).

Minasyan et al. beschrieben 2017 über 30 Mio. Fälle von Sepsis weltweit jährlich mit einer Mortalität von über 30% (Minasyan, 2017). Frauen scheinen eine niedrigere Inzidenz aufzuweisen, während die Mortalität keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigt (Gotts and Matthay, 2016).

1.3 Ätiologie der mikrobiellen Sepsis

Lediglich bei 59-69% aller Sepsis-Fälle werden Erreger diagnostiziert, die in über 70% Bakterien darstellen. Mit ca. 1% werden Viren als Ursprung der Sepsis vermutlich zu selten nachgewiesen und deshalb häufig unterschätzt (Phua et al., 2013; Zahar et al., 2011). Vor allem bei einem respiratorischen Ursprung der Sepsis sind beispielsweise Influenzaviren, Rhinoviren oder SARS-CoV-2 nennenswert (Southeast Asia Infectious Disease Clinical Research, 2017). Laut der EPIC-II-Studie 2007 gelten jedoch

gramnegative Bakterien mit 62% als häufigste Ursache einer Sepsis, vor allem *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella* spp. Bei 47% wurden grampositive Keime nachgewiesen, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus pneumoniae* und bei 19% Pilze (Vincent et al., 2009). Häufig scheint eine Sepsis allerdings auch Folge einer polymikrobiellen Infektion zu sein (Minasyan, 2017). Es handelt sich in absteigender Häufigkeit um Infektionen des Respirationstraktes, abdominale Infektionen, Blutstrominfektionen und urogenitale Infektionen (Vincent et al., 2009).

1.4 Pathophysiologie der Sepsis

Der Auslöser einer Sepsis ist, wie anhand der EPIC-II-Studie dargelegt meistens eine bakterielle Infektion. Eine Sepsis kann aber auch durch Pilze, Viren oder Parasiten bedingt sein. Die körpereigene Immunantwort auf eine Infektion hängt unter anderem von der Pathogenität des Erregers, von genetischen Komponenten und Komorbiditäten des Patienten ab. Daraus resultieren sowohl Unterschiede in der lokalen als auch in der systemischen Immunantwort (Angus and van der Poll, 2013). Malbrain et al. beschrieben die Pathologie der Sepsis 2014 anhand eines „four hit“ Models (Malbrain et al., 2014). Demnach entwickelt sich aus einer primären Verletzung bzw. einer Infektion ein Multiorgandysfunktionssyndrom („second hit“), das mit einem Verlust der endothelialen Barriere („capillary leak“) mit konsekutivem Übertritt von Albumin in den extravasalen Raum einhergeht (Malbrain et al., 2014). Als „Third Hit“ entwickelt sich daraus ein global erhöhtes Permeabilitäts-Syndrom und letztendlich als „fourth hit“ eine Hypovolämie mit mikrozirkulatorischer Dysfunktion (Malbrain et al., 2014).

Eine Sepsis entsteht durch eine Dysbalance pro- und antiinflammatorischer Reaktionen des Immunsystems. Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) binden an Pathogenerkennungszellrezeptoren (pathogen recognition receptors PRRs) von Immunzellen und stimulieren diese z.B. über Toll-like-Rezeptoren. Die aktivierten Immunzellen setzen wiederum verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei. Durch die Zytokine werden verschiedene Signalwege kaskadenartig aktiviert und es entsteht eine systemische überschießende Immunreaktion (Angus and van der Poll, 2013).

Eine Sepsis geht meistens mit einer Alteration und mit Einschränkungen des Gerinnungssystems einher, die zu einer disseminierten intravaskulären Gerinnung (disseminated intravascular coagulation, DIC) führen können (Angus and van der Poll, 2013). Eine Schlüsselrolle übernimmt hierbei der „tissue factor“ (TF) als Zelloberflächenrezeptor für den Serinproteasenfaktor VIIa. Der TF bildet zusammen mit Faktor VIIa den Gewebefaktor und beeinflusst den extrinsischen Gerinnungsweg. Andererseits ist TF mit einer Proteinfamilie verwandt, die als Zytokinrezeptor-Klasse-II-Familie bekannt ist; diese Rezeptorfamilie wiederum wird durch Zytokine aktiviert. Die vermehrte Freisetzung des TF und verminderte antikoagulatorische Mechanismen wie beispielsweise eine Störung des Protein C-Systems und Antithrombin führen zu einer vermehrten Thrombusbildung und somit zu einem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren. Ebenfalls kommt es zu einer Störung der Fibrinolyse durch eine vermehrte Freisetzung des Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (Malbrain et al., 2014).

Das Risiko für (Mikro-)Thromben wird dadurch erhöht und führt letztlich zur Minderperfusion des Gewebes. Diese wird durch andere Folgen der Sepsis, wie eine absolute und relative Hypovolämie durch Übertritt von Plasma aus dem Intravasalraum in die Gewebe infolge erhöhter Permeabilität der Kapillaren und arteriöler Vasodilatation verstärkt. Bei vermindertem Herzzeitvolumen und systemarteriellem Widerstandsverlust resultiert unbehandelt eine ausgeprägte arterielle Hypotension. Mitursächlich für das sogenannte „capillary leak“ mit Albuminverlust ist die inflammations-bedingte Schädigung der endothelialen Barrierefunktion mit Verlust von „tight junctions“ und Cadherinen, erhöhten Werten von Angiopoetin-2 und einer Dysbalance zwischen dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor und dem Sphingosin-3-Phosphat-Rezeptor in der Membran von Endothelzellen (Angus and van der Poll, 2013). Dabei kann das interstitielle Ödem durch mikrovaskuläre Kompression und verlängerte Diffusionsstrecke für Sauerstoff die Gewebeoxygenierung weiter einschränken (Angus and van der Poll, 2013).

1.5 Diagnostik

Bereits die Surviving Sepsis Campaign (SSC)-Leitlinien von 2016 geben das Ein-Stunden-Maßnahmenbündel als Handlungsempfehlung aus. Dieses wurde von der aktuellen Leitlinie aufgegriffen und als Handlungsempfehlung weitergeführt wird. Dazu

gehören die Messung des Laktatwertes, die Abnahme von Blutkulturen, eine kalkulierte Breitspektrum-Antibiotika-Therapie sowie eine angemessene Flüssigkeitssubstitution, aber auch die Verabreichung von Vasopressoren, wenn dies klinisch angezeigt ist (Evans et al., 2021b; Rhodes et al., 2017). Die Laktat-Messung dient der Detektion einer Minderperfusion des Gewebes. Ein Wert größer 2 mmol/l gilt dabei als pathologisch. Der Laktat-Serumspiegel korreliert hierbei mit einem signifikanten Anstieg der Patientensterblichkeit vor allem in Verbindung mit einer arteriellen Hypotension (Casserly et al., 2015).

Des Weiteren wird die Abnahme von mindestens zwei Blutkultur-Flaschenpaaren und die zeitnahe Verabreichung von kalkulierter Breitspektrum-Antibiotika empfohlen. Hierbei soll darauf geachtet, dass die Blutkulturen entsprechend vor der Antibiotika-Gabe abgenommen werden. Bei Hypotonie oder Laktatwerten ≥ 4 mmol/l soll eine angemessene Flüssigkeitssubstitution mit 30 ml/kg kristalloider/balancierter Infusionslösungen begonnen werden. Vasopressoren, wie z.B. Noradrenalin, sollen bei persistierender Hypotonie während oder nach der Flüssigkeitssubstitution zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Drucks ≥ 65 mmHg appliziert werden.

Eine wichtige Rolle spielt außerdem die primäre Evaluation eines Infektionsherdes mittels Anamnese und körperlicher Untersuchung. Tellor et al. haben für die intraabdominelle Sepsis bereits den Einfluss der Fokussuche mit nachfolgender Fokuskontrolle auf die Patientensterblichkeit nachgewiesen (Tellor et al., 2015).

Zur Unterstützung dieser primären Evaluation des vermeintlichen Infektionsherdes spielen bildgebende Verfahren zur Fokussuche eine entscheidende Rolle. Sonographie oder Echokardiographie alleine werden sehr selten zur Fokussuche eingesetzt, es sei denn, es handelt sich um spezifische Fragestellungen, wie den Verdacht auf eine Endokarditis. Vor allem dienen beide Verfahren als Standardverfahren der Intensivmedizin zur Evaluierung der Flüssigkeits- und Katecholamintherapie und können zu Veränderungen des Therapieregimes führen (Bernier-Jean et al., 2017; Spencer et al., 2013).

Die Computertomographie (CT) spielt eine wichtige Rolle zur initialen Fokussuche, da sie auch bei beatmeten Patienten unter intensivmedizinischer Therapie zeitnah durchgeführt werden kann. Um Infektionsherde zu finden, wird über eine venöse Phase beispielsweise ein Pleuraempyem differentialdiagnostisch abgegrenzt. Des Weiteren kann eine Beurteilung der parenchymatösen Oberbauchorgane und des Darmes erfolgen (Barkhausen et al., 1999). Die CT führt bei intensivpflichtigen

Patienten mit Sepsis oder unbekanntem Infektionsherd zur Diagnosestellung und somit zur Anpassung der Therapie. Aufgrund der hohen klinischen Auswirkung bei diesen Patienten sollte bei unklarer klinischer Infektion eine CT zur Fokusabklärung durchgeführt werden (Kütting, 2020).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) spielt aufgrund ihrer längeren Untersuchungsdauer und der Inkompatibilität vieler intensivmedizinischer Hilfsmittel mit dem Magnetfeld eher eine untergeordnete Rolle. Sie bietet vor allem Vorteile bei der Detektion von Abszessen und Flüssigkeitsverhalten (Oto et al., 2011).

Des Weiteren gehören zur Fokussuche noch verschiedene andere bildgebende Methoden wie das konventionelle Röntgen, bildgebungsgesteuerte Drainage-Einlagen und die Positronenemissions-Computertomographie (PET-CT).

Biomarker haben vor allem einen Wert im Hinblick auf die Therapiesteuerung und das Ansprechen auf die therapeutischen Maßnahmen auf der Intensivstation. Der Fokus liegt insbesondere auf dem Procalcitonin (PCT) und dem C-reaktivem Protein (CRP). Procalcitonin wird als Marker für eine bakterielle Infektion angesehen. Es steigt ab zwei bis vier Stunden nach der Infektion bis es seinen Spitzenwert nach ca. 14 Stunden erreicht hat (Dandona et al., 1994). Vor allem die Kinetik des Biomarkers ist von prognostischer Bedeutung, wie in der MOSES-Studie gezeigt wurde. Ein Abfall scheint prognostisch günstig, während hohe Spitzen mit einer höheren Erkrankungsschwere korrelieren (Schuetz et al., 2017). Außerdem wiesen verschiedene Fokusse unterschiedlich hohe PCT-Konzentrationen auf. So steigt das PCT bei einer Endokarditis kaum an, bei abdominalen bzw. pulmonalen Infektionen wiederum stärker (Hu et al., 2017). Wegen der eingeschränkten Sensitivität und Spezifität des PCTs reicht dieser Biomarker allein nicht, um die Diagnose einer Sepsis zu stellen (Bakhtiar et al., 2021) und wird deshalb von der aktuellen Leitlinie nicht als Diagnostikparameter empfohlen (Evans et al., 2021a).

Einen weiteren Biomarker stellt das CRP dar, das jedoch auch durch viele nicht-infektiologische Auslöser erhöht sein kann. Es scheint jedoch ebenfalls mit der Erkrankungsschwere der Patienten zu korrelieren und kann somit auch zum Therapiemonitoring verwendet werden (Povoa et al., 2005; Schmit and Vincent, 2008). Interleukin-6 gilt wie CRP als Akut-Phase-Protein, das allerdings ebenfalls besonders stark durch nicht-infektiöse Stimuli ausgeschüttet wird und sich nur bedingt zum Therapiemonitoring eignet (Jekarl et al., 2013; Vincent et al., 2013).

Je nach betroffenem Organsystem gibt es weitere laborchemische Parameter, die zusätzlich genutzt werden können, wie beispielsweise die Lipase bei Pankreatitis.

Tabelle 2: „initial resuscitation“ der SSC-Leitlinien nach Evans et al. 2021

- Messung des Laktatwertes, pathologisch ab $>2\text{mmol/l}$
- Abnahme von Blutkulturen vor Antibiotikagabe
- Beginn einer Breitspektrum-Antibiotikatherapie, idealerweise innerhalb einer Stunde
- Flüssigkeitssubstitution mit 30ml/kg kristalloider Infusionslösung innerhalb der ersten 3 Stunden
- i.v. Infusion von Vasopressoren bei volumenrefraktärer Hypotension für einen $\text{MAD} \geq 65\text{mmHg}$
- Verwendung der „capillary refill time“
- Verwendung von dynamischen Parametern zum Volumenmanagement

Zeitpunkt des Beginns ist definiert als Ankunft im Krankenhaus oder falls sich der Patient bereits im Krankenhaus befindet als frühester Zeitpunkt nach Erkennen der Sepsis-Symptome.

1.6 Klinik der Sepsis

Zu einem großen Bestandteil hängt die initiale Klinik von der Ätiologie der Sepsis ab (Malbrain et al., 2014). Allgemeinsymptome der Sepsis sind Schläfrigkeit, Schüttelfrost und Verwirrtheit. Des Weiteren wird die Schwere der Sepsis durch die Intensität assoziierter Organdysfunktionen anhand des SOFA-Score (siehe Tabelle 1) erfasst. Wie eingangs erwähnt, beginnt eine Sepsis oftmals mit einem „First Hit“, also einer akuten Verletzung bzw. einem akuten Infekt, dessen Symptome von der jeweiligen Ätiologie abhängig sind (Malbrain et al., 2014). So führt eine akute Pankreatitis zum Beispiel zu gürtelförmigen Oberbauchschmerzen, bei einer Pneumonie kommt es zu Husten mit Auswurf und Tachypnoe und bei einem Harnwegsinfekt zur Dysurie und Pollakisurie (De Waele et al., 2014; Minasyan, 2017; Tellor et al., 2015). Die kompensatorische Aktivierung des Sympathikotonus in Reaktion auf Hypovolämie - und Vasodilatation bedingter Hypotonie führen zum oftmals beeindruckenden Anstieg der Herzfrequenz (Tachykardie). Fieber entsteht infolge der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine mit Steigerung des Metabolismus und konsekutiv erhöhtem Sauerstoffbedarf. Zudem können bakterielle Endotoxine das Atemzentrum direkt stimulieren und eine Zunahme der Atemfrequenz auslösen. Typisch ist bei überschießender Ventilation eine Abnahme des Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut (PaCO_2), wobei im Initialgeschehen bei noch fehlender (an)aerober Produktion von Milchsäure eine überwiegende respiratorische Alkalose auftreten

kann. Nur selten und als Ausdruck einer besonders schweren Sepsis tritt auch eine Hypothermie auf (Angus and van der Poll, 2013). Mit Fortschreiten der Sepsis tritt am häufigsten mit bis zu 64% eine pulmonale Störung auf (Gotts and Matthay, 2016). Ein Nierenversagen führt zu Elektrolytstörungen, urämischen Symptomen, Störungen des Säure-Base- und des Flüssigkeitshaushaltes (Prescott and Angus, 2018). Durch die bereits beschriebene DIC kann es außerdem zu Mikrothrombosen und Blutungen kommen (Angus and van der Poll, 2013). Überlebende der Sepsis weisen funktionelle Beeinträchtigungen auf, wie beispielsweise milde bis schwere kognitive Einschränkungen und psychische Probleme (Prescott and Angus, 2018). Außerdem ist eine Sepsis ein Risikofaktor für die häufig nach einem längeren Aufenthalt auf der Intensivstation erworbene „Critical Illness Myopathie“ und Polyneuropathie (Kress and Hall, 2014).

1.7 Therapie der Sepsis

Die SSC-Leitlinien aus dem Jahr 2012 empfahlen zuletzt die „Early Goal-Directed Therapy“ als Grundbaustein zur Stabilisierung septischer Patienten (Rhodes et al., 2017). Mittlerweile steht das „one hour bundle“ im Mittelpunkt der Therapie, die Messung des zentralvenösen Drucks, des mittleren arteriellen Drucks, der Urinproduktion und der zentralvenösen Sättigung wird jedoch immer noch empfohlen. In der neusten Leitlinie werden außerdem die Verwendung von dynamischen Parametern wie der Schlagvolumenvarianz empfohlen, um das Volumenmanagement zu verbessern (Evans et al., 2021b; Rhodes et al., 2017).

Das „hour-1 bundle“ stellt sowohl den ersten Schritt der Diagnostik als auch der Therapie einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks dar, das seit den Leitlinien der Surviving Sepsis Campaign 2004 existiert (Dellinger et al., 2004; Dellinger et al., 2008; Dellinger et al., 2013). Die Einhaltung dieser Maßnahmen konnte die Sterblichkeit um ca. 25% reduzieren (Levy et al., 2015). 2018 wurde daraufhin ein überarbeitetes „hour-1 bundle“ basierend auf der 2017 publizierten Leitlinie veröffentlicht. Es beinhaltet die antimikrobielle Therapie durch Gabe eines Breitbandantibiotikums, sowie die schnellstmögliche Gabe von 30 ml/kgKG balancierten Kristalloiden bei Hypotension oder einem Serumlaktat > 4 mmol/l und den Einsatz von Vasopressoren mit dem Zielwert des mittleren arteriellen Druckes (MAD) von > 65 mmHg empfohlen, falls trotz adäquater Volumentherapie weiterhin eine Hypotension besteht. Ein erhöhtes Laktat

geht mit einer signifikant erhöhten Sterblichkeit einher, sodass empfohlen wird bei einem Laktat von größer/gleich 2 mmol/l die Messung nach zwei bis vier Stunden zu wiederholen (Casserly et al., 2015; Rhodes et al., 2017).

Einer der wichtigsten Eckpfeiler der Therapie stellt die Fokussanierung dar, also das Beheben des ursächlichen Infektionsgeschehens. Dazu gehört auch schnellstmöglich liegende intravasale Zugänge zu entfernen, um diese als Infektionsquelle auszuschließen (Evans et al., 2021a; Rhodes et al., 2017). Die MEDUSA-Studie aus dem Jahr 2014 zeigt, dass der Beginn der Fokussanierung innerhalb der ersten sechs Stunden entscheidend für die Prognose der Patienten ist. Sollte die Sanierung erst nach sechs Stunden begonnen werden, zeigt sich eine signifikante Verschlechterung der Prognose (Bloos et al., 2014). Es gibt bisher noch kein vorgegebenes Zeitintervall, in dem eine chirurgische Fokussanierung durchgeführt werden soll. Übereinstimmung in der Literatur herrscht jedoch diesbezüglich, dass sie schnellstmöglich stattfinden sollte (Evans et al., 2021a).

Wie im „hour-1 bundle“ und in der „initial resuscitation“ empfohlen, sollte schnellstmöglich eine antimikrobielle Therapie begonnen werden. Diese besteht bei Patienten mit Sepsis aus einer Monotherapie mit einem empirischen Antibiotikum und bei Vorliegen eines septischen Schocks in einer Kombinationstherapie (Evans et al., 2021a; Rhodes et al., 2017). Diese sollte innerhalb der ersten Stunde erfolgen, da die Sterblichkeit signifikant steigt, wenn die antibiotische Therapie erst in der zweiten Stunde verzögert appliziert wird (Ferrer et al., 2014). Auch die neuen Empfehlungen von 2021 befürworten eine antimikrobielle Therapie innerhalb einer Stunde nach Bemerkung der Sepsis (Evans et al., 2021a). Die Dosis des Antibiotikums muss hierbei an eventuelle Veränderungen des Verteilungsvolumens und an die Nieren- bzw. Leberfunktion bei Intensivpatienten angepasst werden (Roberts et al., 2014).

Zur Therapie der Hypotension bzw. bei einem Serumlaktatspiegel von mindestens 4 mmol/l muss eine adäquate Volumen- und Katecholamintherapie erfolgen. Hier empfehlen die SSC-Leitlinie 2016 und die neusten Richtlinien 2021 einen Flüssigkeitsbolus von 30 ml/kgKG innerhalb der ersten drei Stunden (Evans et al., 2021a; Rhodes et al., 2017). In einer prospektiven Studie von Leisman et al. an 11182 Patienten wurde gezeigt, dass Patienten, die innerhalb der ersten halben Stunde den entsprechenden Flüssigkeitsbolus erhielten, die niedrigste Sterblichkeit aufwiesen (Leisman et al., 2017). Die CLASSIC-Studie setzte sich damit auseinander, wie die Volumentherapie im weiteren Verlauf fortgeführt werden sollte, und verglich eine

Patientengruppe mit restriktiver Flüssigkeitsgabe mit einer Gruppe mit Standardvolumengabe. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der 90-Tage-Sterblichkeit, der Beatmung oder der Nierenersatztherapie. Allerdings kam es bei der zurückhaltenden Volumengabe zu einer häufigeren Verschlechterung der Nierenfunktion (Hjortrup et al., 2016). Idealerweise sollte eine regelmäßige Reevaluation des Volumenbedarfs der Patienten erfolgen. Die S3-Leitlinie zur „Intravasalen Volumentherapie beim Erwachsenen“ und die aktuelle Sepsis-Leitlinie empfehlen hierfür dynamische und flussbasierte Parameter und die Echokardiographie (Evans et al., 2021a; Marx et al., 2016). Des Weiteren kann der „Passive Leg Raise“-Test als klinischer Test Aufschluss über den Volumenbedarf der Patienten geben. Sollten der mittlere arterielle Blutdruck, das Herzzeitvolumen oder das Schlagvolumen bei Anheben der Beine ansteigen, kann dies ein Zeichen für einen Volumenbedarf sein (Monnet et al., 2016). Als Flüssigkeitsersatz empfehlen die SSC-Leitlinie ebenso wie die neusten Richtlinien isotonische, balancierte Kristalloide (Evans et al., 2021b; Rhodes et al., 2017). 0,9%ige NaCl-Lösung wird nicht empfohlen, da sie den Säure-Base-Haushalt stören kann und das Risiko einer hyperchlorämischen Azidose steigert (Vincent and De Backer, 2016). Sowohl die SMART-Studie als auch die SALT-ED-Studie zeigten Vorteile der balancierten kristalloiden Lösung gegenüber 0,9%iger NaCl-Lösung bezüglich renaler Komplikationen (Self et al., 2018; Semler et al., 2018). Mit der Frage, ob Kristalloide oder Kolloide wie Hydroxyethylstärke bzw. Albumin von Vorteil sind, beschäftigten sich sowohl die SAFE-Studie 2004 als auch die ALBIOS-Studie 2014. Es zeigte sich in keiner Studie eine signifikante Reduktion der 28-Tage-Sterblichkeit (Caironi et al., 2014; Finfer et al., 2004). In der Theorie haben Kolloide einen längerfristigen Effekt auf das intravasale Volumen, da große Moleküle den kolloidosmotischen Druck erhöhen. Sie haben aber auch ein hohes Nebenwirkungsprofil, wie akute Nierenschädigung, Anaphylaxie und Gerinnungsbeeinträchtigungen (Brown and Semler, 2019).

Eine weitere Säule in der Sepsis-Therapie stellt die Erhaltung bzw. Wiederherstellung der Perfusion überlebenswichtiger Organe dar. Sollte trotz adäquater Volumentherapie ein MAD von mindestens 65 mmHg nicht erreichbar sein, wird in der „initial resuscitation“ in der SSC-Leitlinie die kontinuierliche Applikation von Noradrenalin empfohlen (Evans et al., 2021a). Zur Diskussion steht der Zielwert des MAD. Die SEPSISPAM-Studie vergleicht eine Subgruppe mit einem Ziel-MAD von 65-70 mmHg mit einer zweiten Subgruppe mit einem Ziel-MAD von 80-85 mmHg. Hier

sah man einen signifikant häufigeren Kreatinin-Anstieg bei niedrigerem MAD (Asfar et al., 2014). Vor dem Hintergrund einer Studie von Lamontagne et al. spricht sich die SSC-Leitlinie aufgrund einer dort nachgewiesenen reduzierten Krankenhaussterblichkeit bei älteren Patienten mit niedrigeren MAD-Werten sowie einer erhöhten Rate von Herzrhythmusstörungen bei erhöhten Katecholamindosen gegen höhere MAD-Zielwerte aus (Lamontagne et al., 2016; Rhodes et al., 2017). Generell gilt als MAD-Zielwert ein Wert von 65 mmHg den neusten Richtlinien entsprechend (Evans et al., 2021a).

Dobutamin zur Katecholamintherapie wird nur bei persistierender Hypoperfusion trotz Volumen- und Noradrenalintherapie zur Therapie eines nicht ausreichenden Herzzeitvolumens empfohlen (Evans et al., 2021a). Adrenalin weist keinen Vorteil gegenüber einer Therapie von Noradrenalin in Kombination mit Dobutamin auf (Annane et al., 2007).

Ein weiteres Inotropikum stellt der Kalzium-Sensitizer Levosimendan dar, der jedoch als Therapiepartner keinen Einfluss auf die Organdysfunktion und Sterblichkeit hat (Gordon et al., 2016).

Umstritten ist weiterhin der Einsatz von Kortikosteroiden. Die ADRENAL-Studie zeigte, dass sich Patienten im septischen Schock unter Hydrocortison schneller stabilisierten und für kürzere Zeit eine invasive mechanische Beatmung benötigen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der 90-Tage-Sterblichkeit (Venkatesh et al., 2018). Die darauffolgende APROCCHSS-Studie ergab wiederum eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit auf der Intensivstation, sobald die Patienten kombiniert mit Hydrokortison und Fludrokortison therapiert wurden. Außerdem war die Dauer der Vasopressorgabe in der Gruppe der behandelten Patienten gegenüber der Placebogruppe reduziert (Annane et al., 2018). Durch die unterschiedlichen Ergebnisse der Studienlage fehlt eine klare Evidenz. Während es in der SSC-Leitlinie 2016 keine Empfehlung zum Einsatz von Kortikosteroiden gibt, außer wenn die hämodynamische Stabilisierung trotz optimaler Volumen- und Katecholamintherapie nicht erreicht werden kann (Rhodes et al., 2017), scheinen die aktuellen Richtlinien eine eindeutige Empfehlung für den Einsatz von Kortikosteroiden auszusprechen (Evans et al., 2021a).

1.8 Zytokine

Im Rahmen der Infektion werden wie bereits beschrieben verschiedene Zytokinkaskaden durch die Erreger-Bestandteile freigesetzt. Diese Zytokine lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen: proinflammatorische Zytokine, die das weitere Immunsystem aktivieren und zu Gewebeschäden führen können, antiinflammatorische Zytokine, die der Entzündung entgegenwirken, Chemokine, die andere Zellen rekrutieren und schließlich Wachstumsfaktoren. Es gibt verschiedene Zytokine, die die NK-Zellen aktivieren, bzw. eine Interferon-gamma (IFN- γ)-Ausschüttung bewirken, die wiederum Monozyten stimuliert, weitere Zytokine auszuschütten, um eine Polarisierung der T-Zellen zu TH1-Helferzellen zu bewirken. TH1-Helferzellen spielen eine entscheidende Rolle in der antibakteriellen Immunantwort. Zytokine, die an dieser Achse beteiligt sind, sind IFN- γ , „Monokine induced by gamma-interferon“ (MIG), „Macrophage inflammatory protein“ (MIP)-1b, „Macrophage colonie-stimulating factor“ (M-CSF) und „Regulated and normal T-cell expressed and secreted“ (RANTES).

1.9 Sepsis Modelle

Um verschiedene vielfältige Aspekte der Sepsis besser verstehen und therapieren zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Sepsis-Tiermodelle entwickelt.

1.9.1 „Cecal Ligation and Puncture“

Das CLP-Modell ist aktuell noch der Goldstandard zur Induktion einer Sepsis z.B. bei Mäusen. Es ist ein Modell, welches die Situation einer Darmperforation oder Nahtinsuffizienz nach Darmoperation bei einem Patienten und damit eine Sepsis abdominalen Ursprungs imitiert. Die Versuchstiere werden hierfür nach Rasur und chirurgischer Desinfektion median laparotomiert, dann wird das Zöekum meist im rechten Unterbauch identifiziert, mit einem Faden abgebunden und mit einer Nadel punktiert. Die Schwere der Sepsis lässt sich unter anderem durch die Wahl der Nadelgröße und die Zahl der Punktionen sowie durch die Länge des ligierten Abschnitts variieren. Im Anschluss daran wird das Zöekum wieder in die Bauchhöhle zurückgelegt und die Laparotomie verschlossen. Hierbei erfolgt zuerst ein Verschluss der Muskulatur mit Fäden und daraufhin der Hautverschluss mittels metallischen Clips.

Je nach Versuch wurden die Mäuse nahezu in Analogie zum „hour-1 bundle“ mit Flüssigkeit oder Antibiotikum behandelt (Seemann et al., 2017; Wen, 2013). Dennoch kam es zu einer bakteriellen Peritonitis, die sich dann zu einer Sepsis entwickelte (Rittirsch et al., 2009). Das CLP-Modell kann jedoch eine wenig kontrollierbare große Variabilität der Sepsis zeigen, die u.a. auch Untersucher-abhängig ist. Des Weiteren können sowohl akute als auch chronische Verläufe induziert werden, was Vorteil und Nachteil des Modells zugleich sein kann (Rittirsch et al., 2009). Insgesamt wird das Modell nicht zuletzt auch wegen der hohen Belastung der Tiere und seiner schlechten Standardisierbarkeit zunehmend weniger häufig eingesetzt.

1.9.2 Lipopolysaccharid-Modell

Die Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) bzw. Endotoxinen gramnegativer Bakterien (LPS-Modell) beinhaltet die direkte Applikation von Lipopolysacchariden in das Blut, die Lunge oder das Peritoneum. Diese Modelle sind somit primär steril und daher weniger einem Infektionsgeschehen ähnlich als vielmehr einer Intoxikation durch bakterielle Produkte. Das applizierte LPS führt zu einem starken Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen und einer schnellen Induktion eines septisch-toxischen Krankheitsbildes (Seemann et al., 2017). Vorteile des Modells sind das einfache Versuchsprotokoll sowie die Reproduzierbarkeit der inflammatorischen Antwort (Seemann et al., 2017). Die Sensitivität auf das Toxin unterscheidet sich allerdings stark zwischen Menschen und Mäusen, außerdem ist die inflammatorische Antwort der Mäuse deutlich schwächer und kürzer als beim Menschen (Stortz et al., 2017). Ein weiterer Nachteil des Modells ist, dass es meistens nicht die hyperdynamische Phase der Sepsis nachahmen kann, die mit einer Erhöhung des Herzzeitvolumens bei erniedrigtem Gefäßwiderstand einhergeht (Fink and Heard, 1990; Rabuel and Mebazaa, 2006).

1.10 Fragestellung

Angesichts der aufgezeigten Limitationen des CLP-Modells und des LPS-Modells ist das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, ein bislang nur wenig charakterisiertes neues Modell für die Entwicklung einer bakteriellen Sepsis bei der Maus zu etablieren, welches dem Krankheitsverlauf einer Sepsis abdominalen Ursprungs beim Patienten vergleichbar nahe kommt (Starr et al., 2014).

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Kann eine abdominelle Sepsis durch die intraperitoneale Injektion von „Cecal Slurry“ (sog. „Cecal Slurry“- (CS) Modell) erreicht werden?
2. Ist eine Standardisierung des Krankheitsverlaufs hinsichtlich Schwere und Dauer möglich?
3. Ist eine Charakterisierung der infektions-induzierten Zytokin-Profile zu verschiedenen Zeitpunkten möglich bzw. detektierbar?
4. Welche Auswirkungen hat eine systemische Therapie mit einem Breitspektrumantibiotikum auf den Krankheitsverlauf und insbesondere auf die infektions-induzierten Zytokin-Profile?

Ausgehend von den ersten Arbeiten von Starr et al. 2014 wurde Faeces aus dem Zoekum von Mäusen gewonnen, welches über definierte Arbeitsschritte für eine intraperitoneale Injektion vorbereitet wurde. Die Ausprägung der Sepsis beim Versuchstier wurde hierbei reproduzierbar und vergleichbar durch das applizierte Volumen der CS-Präparation herbeigeführt (Starr et al., 2014). Da hierfür in der Universitätsmedizin Mannheim keine Erfahrungswerte vorliegen, wurde in einem ersten Versuchsteil I die Schwere des Krankheitsverlaufs anhand eines auf klinischen Zeichen basierenden Scoring-Systems mit dezidierten Abbruchkriterien der Versuche und der Mortalitätsrate adjustiert. Hierzu wurde eine „optimale“ Dosis an CS evaluiert und der Einfluss der Zeitintervalle bis zum Beginn und der Wiederholung einer Antibiotikatherapie geprüft, um die klinische Therapie der Sepsis miteinzubeziehen (Initiierung und Fortsetzung der Antibiotika- und Volumentherapie des „hour-1 bundle“). Diese zielte auf eine reduzierte akute Mortalität ab, um die Ausfallrate von Tieren zu verringern und einen verlängerten Krankheitsverlauf zu realisieren. Alle Tiere erhielten zudem eine analgetische Therapie mit dem synthetischen Opioid Buprenorphin s.c. und ergänzend per os durch Zusatz im Trinkwasser. In Versuchsteil II erfolgte die Charakterisierung des Modells anhand des „Murine Sepsis Score“ (MSS), der Bakterienlast im Blut, der Leber, der Milz, der Leukozytenzahl im Blut, verschiedener klinisch-chemischer Variablen der Organfunktion und -integrität, einer umfassenden Anzahl an Plasmazytokinen sowie der Körpertemperatur insbesondere auch auf die Effekte der Antibiotikatherapie. Insgesamt gewährleistet das CS-Modell gemäß ersten Publikationen eine bessere Reproduzierbarkeit mit deutlicher Reduktion der Belastung für die Versuchstiere (Starr et al., 2014).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierversuche erfolgten im Einklang mit dem geltenden Tierschutzgesetz und den ethischen Richtlinien nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (35-9185.81/G-132/17) in der tierexperimentellen Anlage des Zentrums für Medizinische Forschung im Universitätsklinikum Mannheim.

Die Versuche wurden an ca. 12-14 Wochen alten, männlichen C57/Bl6- Mäusen der Firma Janvier mit einem Körpergewicht von ca. 20-25 g durchgeführt. Die Versuchstiere kamen mit einem Alter von 10 Wochen in die tierexperimentelle Einrichtung, wo sie weitere zwei Wochen bis zum eigentlichen Versuchsbeginn artgerecht gehalten wurden, um sich den veränderten Bedingungen anzupassen. Zusammen mit maximal fünf Artgenossen wurden sie in steril belüfteten Käfigen bei 21°C einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden ausgesetzt und erhielten pelletiertes Zucht- oder Haltungsfutter und angesäuertes Wasser ad libitum. Die Versuchstiere wurden 24 Stunden vor dem Versuchsstart in einen isolierten S2-Raum gebracht, in dem die Versuche ohne äußere Einflüsse durchgeführt werden konnten. Dort wurde über dem Käfig eine Infrarotkamera für die kontaktlose Erfassung der Körpertemperatur angebracht. Ab der Injektion des CS wurde zusätzlich Nassfutter ad libitum angeboten.

2.2 CS-Präparation

Die CS-Herstellung erfolgte nach dem Protokoll von Starr et al. 2014 (Starr et al., 2014). Vier Monate alte C57/Bl6 Mäuse wurden nach einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran mittels cervikaler Dislokation euthanasiert und das gesamte Zoekum jeder Maus im Rahmen einer Längslaparotomie asserviert. Der Inhalt wurde steril aus dem Darm präpariert und von allen Mäusen zusammen in sterilen Reagenzgläsern vereinigt, gewogen und mit sterilem Wasser vermischt mit einem Mischungsverhältnis von 0,5 ml sterilem Wasser pro 100 mg zoekalem Darminhalt. Pro Maus wurde ungefähr 300 mg Darminhalt asserviert.

Anschließend wurde dieser CS sequenziell durch zwei verschiedene sterile Siebe mit einem 85 ml Homogenisierer (Bellco Glass, 1985-85000) gefiltert, zu Beginn mit der

Porengröße 860 µm (Bellco Glass, 1985-00020) und dann mit 190 µm (Bellco Glass, 1985-00080). Da weiterhin Debris sichtbar war, fand ein weiterer Filterungsprozess mit 70 µm (Bellco Glass, 1985-00200) statt.

Der gefilterte CS wurde mit dem gleichen Volumen an 30% Glycerol (Kraft, 07091.3000) in Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS-Puffer) vermischt. Resultierend daraus entstand die finale CS-Lösung mit 15% Glycerol. Während ständigem Rühren mittels Magnetrührstab, um die Sedimentierung zu verhindern, wurde der CS portionsweise in 2 ml Kryoröhrchen pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren.

Von dem gewonnenen CS wurden zwei Proben an das Institut für Mikrobiologie der Universitätsmedizin Mannheims (UMM) gegeben, um die Bakterienlast zu bestimmen. Eine Probe wurde direkt nach der Herstellung dort abgegeben, während die zweite Probe 24 Stunden später nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Aufbewahrung bei -80°C abgegeben wurde.

2.3 „Murine Sepsis Score“

Zur klinischen Beurteilung der Erkrankungsschwere bei den Versuchstieren wurde am Tag der CS-Injektion in den ersten acht Stunden alle zwei Stunden der „Murine Sepsis Score“ modifiziert nach Shrum et al. erhoben (s. Tabelle 3) (Shrum et al., 2014). Danach wurde die Beeinträchtigung der Tiere alle acht Stunden mit dem beschriebenen Score dokumentiert.

Bei einer Punktzahl zwischen null und 8 ließ sich von keiner bzw. einer leichten Beeinträchtigung sprechen, bei 9 bis 21 Punkten zeigte sich eine mittlere bis schwere Beeinträchtigung und bei 22 bis 28 Punkten konnte man schwerste Beeinträchtigungen der Versuchstiere sehen. Sowohl bei einem Gesamtwert über 22 Punkte als auch bei einem Einzelwert von vier in einem der erhobenen Parameter wurde der Versuch abgebrochen und das entsprechende Versuchstier mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Bei Erreichen eines Scores unter 5 wurde die Antibiotikatherapie beendet.

Tabelle 3: Murine Sepsis Score als klinischer Score zur Beurteilung der Tiere nach Shrum et al., 2014

Erscheinung	0	weiches Fell
	1	teilweise sind Fellhaare aufgerichtet
	2	Die Mehrheit der Haare sind aufgerichtet
	3	Das gesamte Fell scheint aufgebauscht
	4	Die Maus erscheint ausgemerkelt
Bewusstsein	0	Die Maus ist aktiv
	1	Die Maus ist aktiv aber vermeidet aufwärts zu stehen
	2	Die Aktivität ist merklich verlangsamt
	3	Die Aktivität ist verlangsamt, die Maus bewegt sich nur auf Provokation
	4	Die Aktivität ist extrem verlangsamt, die Maus bleibt sitzen bei Provokation
Aktivität	0	Normale Aktivität: Die Maus isst, trinkt, klettert und rennt
	1	Leicht gehemmte Aktivität: Die Maus bewegt sich am Käfigboden
	2	Gehemmte Aktivität: Die Maus bewegt sich bis auf gelegentliche Bewegungen nicht
	3	Keine Aktivität: Die Maus bewegt sich nicht
	4	Keine Aktivität: Die Maus zeigt einen Tremor, v.a. an der hinteren Extremität
Antwort auf einen Stimulus	0	Die Maus reagiert unverzüglich auf einen Stimulus
	1	Langsame oder keine Antwort auf einen auditorischen Stimulus, ausgeprägte Reaktion auf Berührung
	2	Keine Antwort auf einen auditorischen Stimulus, moderate Antwort auf Berührung
	3	Keine Antwort auf einen auditorischen Stimulus, kaum Antwort auf Berührung
	4	Keine Antwort auf einen auditorischen Stimulus, minimale bis keine Antwort auf Berührung, die Maus kann sich nicht aufrecht halten
Augen	0	Offen
	1	Nicht vollständig offen, evtl. mit Sekretion
	2	Halb geschlossen, evtl. mit Sekretion
	3	Halb geschlossen oder mehr, evtl. mit Sekretion
	4	Geschlossen oder milchig
Respiratio	0	Normal
	1	Minimal reduzierte Respiratio (nicht zählbar mit bloßem Auge)
	2	Moderat reduzierte Respiratio (an der oberen Grenze, um sie mit dem Auge zu zählen)
	3	Deutlich reduzierte Respiratio (visuell zählbar, 0,5s zwischen den Atemzügen)
	4	Extrem reduzierte Respiratio (>1s zwischen Atemzügen)
Qualität der Respiratio	0	Normal
	1	Kurze Perioden von angestrengtem Atmen
	2	Angestrengt, kein Nach-Luft-Schnappen
	3	Angestrengt mit intermitterendem Nach-Luft-Schnappen
	4	Nach-Luft-Schnappen

2.4 Versuchsprotokoll

2.4.1 Versuchsteil I – Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs

Zu Beginn erfolgte die Suche nach der optimalen Dosis zur Induktion einer Sepsis. In Anlehnung an das Protokoll von Starr et al. und ähnlich der Krankenhausmortalität des Menschen bei der Sepsis von 17% und bei der schweren Sepsis von 26% wurde die optimale Dosis mit einer Überlebensrate von 67% bzw. einer Mortalität von ca. 33% bei 12 bis 14 Monate alten Mäusen festgelegt (Fleischmann et al., 2016; Starr et al., 2014). An Tag 1 der Versuchsreihe wurden die Versuchstiere je 20 Sekunden in eine Narkosebox mit 2,0% Isofluran mit 40% Sauerstoff gelegt. Dann wurden sie mit einer Tierwaage gewogen und am Schwanz mit einer unterschiedlichen Anzahl an Strichen zur Unterscheidung markiert. Es erfolgte eine intraperitoneale Injektion des CS mit aufsteigenden Dosierungen je nach Versuchsgruppe (100 µl, 150 µl, 175 µl, 200 µl, 250 µl), sowie eine subkutane Injektion in die Nackenfalte der Mäuse mit 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®) und 400 µl NaCl. Den Tieren wurde zusätzlich zu ihrem Pelletfutter Nassfutter und mit Buprenorphin versetztes Trinkwasser (3 ml Temgesic® 0,3mg/ml in 100 ml Trinkwasser) ad libitum angeboten.

In den ersten acht Stunden nach der initialen Injektion erfolgte alle 2 Stunden ein Scoring der Versuchstiere anhand des MSS. An den darauffolgenden Tagen fand alle acht Stunden eine Erhebung des genannten Scores statt, sowie eine Symptombehandlung mit Buprenorphin 0,1 mg/kg KG s.c..

Es wurden mehrere Versuchsrunden durchgeführt, bei denen die Tiere in unterschiedlichen Zeitabständen zur initialen CS-Infektion (6h, 8h, 10h, 12h, 16h) mit Flüssigkeit (0,9% NaCl 400 µl) s.c. und Antibiotikum (Imipenem/Cilastatin (50 mg/kg KG ~ 300 µl (5mg/ml bei ca. 30 g KG))) s.c. behandelt wurden, um die gewünschte Krankheitsschwere und Mortalität zu generieren.

Außerdem wurden weitere Versuchsgruppen mit einer Erstinjektion von 150 µl CS und einer zweiten Injektion des CS entweder mit 150 µl oder mit 175 µl kombiniert, um zu untersuchen, ob es damit möglich ist, den septischen Zustand zu verlängern. Die Injektion der zweiten Dosis erfolgte 48 Stunden nach der Induktion der Sepsis, da zu diesem Zeitpunkt in den bereits durchgeführten Gruppen der erhobene MSS bereits regredient war und der Peak der initialen Sepsis vorüber schien.

Bei Versuchstieren, die tot im Käfig gefunden wurden, wurde der Zeitpunkt des Auffindens als Todeszeitpunkt protokolliert.

2.4.2 Versuchsteil II – Charakterisierung des Modells

Nach Standardisierung des CS-Modells in Versuchsteil I hinsichtlich CS-Dosis und Beginn der Volumen- und Antibiotikatherapie führten wir drei Gruppen mit i.p. Injektion von 200 µl CS und einer ersten medikamentösen Behandlung nach 10 Stunden mit dem Breitspektrumantibiotikum Imipenem 300 µl (5mg/ml), NaCl 0,9% 400 µl s.c., Buprenorphin 0,1 mg/kg KG mit je 10 Mäusen durch. Gruppe A wurde sechs Stunden nach CS-Injektion präpariert, Gruppe B 24 Stunden nach Sepsisinduktion und Gruppe C sieben Tagen nach initialer CS-Injektion. Die Behandlung mit Antibiose und Flüssigkeit wurde alle 16 Stunden wiederholt (**Abbildung 2**).

Außerdem wurde eine Gruppe D durchgeführt, die nach Injektion mit 200 µl CS i.p. keine Volumen- oder Antibiotikatherapie erhielt, sondern lediglich alle 8 Stunden Buprenorphin 0,1 mg/kg KG s.c..

Die beschriebenen Versuchsrunden fanden stets in Gruppen mit je fünf Mäusen gleichzeitig statt. Abends vor Beginn einer Versuchsreihe wurden die Mäuse in einen isolierten Versuchsraum gebracht, in dem keine weiteren Tiere gehalten wurden. Über die Nacht wurde die Körpertemperatur der Mäuse mittels Infrarotkamera zur Aufzeichnung von Ausgangswerten gemessen.

Als Kontrollgruppe wurden männliche C57/Bl6-Mäusen ohne Injektionen unter denselben Bedingungen gehalten, gescort und präpariert.

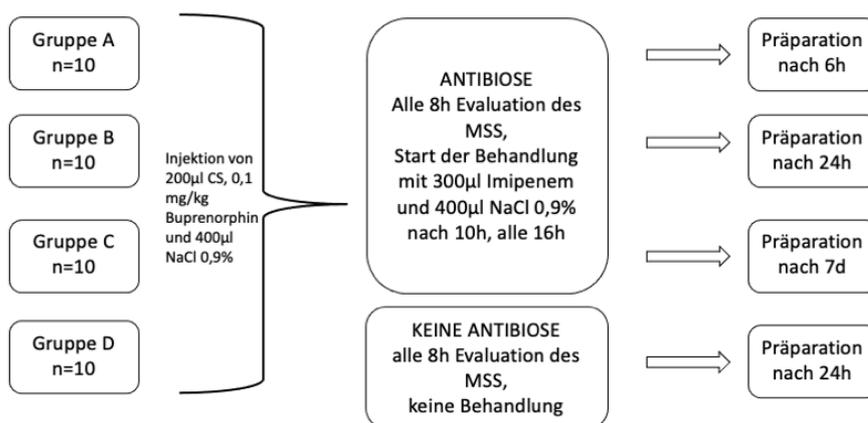


Abbildung 2: Versuchsprotokoll

2.4.3 Präparationen

Alle Gruppen wurden unabhängig von dem Zeitpunkt der Präparationen (6h, 24h, 7d) nach gleichem Schema präpariert. Die Versuchstiere wurden nacheinander ca. 20 s in einen Käfig gelegt, welcher mit 2% Isofluran und 40% Sauerstoff gefüllt war. Danach wurde unter Abzug bei noch erhaltenem Kreislauf beidseits Blut aus dem Plexus ophthalmicus mit Einmal-Mikropipetten entnommen und in einem sterilen Eppendorfgesäß, einem Lithium-Heparin-Röhrchen und einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Das Lithium-Heparin-Röhrchen und das EDTA-Röhrchen wurden sofort auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde das Tier mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Im Zuge einer Längslaparotomie wurde das Abdomen eröffnet. Es wurde die Leber, beidseits die Nieren nach Entkapselung, die Milz, das Diaphragma und die Lunge freipräpariert und entnommen. Direkt nach der Entnahme des jeweiligen Organs wurde es weiterverarbeitet. Sowohl der kaudale Anteil des Lobus hepaticus dexter als auch kaudale Anteil des Lobus hepaticus sinister der Leber wurden in Formalin eingelegt. Der Lobus hepaticus medialis dexter wurde in einem Kryotube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt und das verbliebene Lebergewebe wurde für die Bestimmung der Bakterienlast genutzt. Die rechte Niere wurde ebenfalls zur HE Färbung in Formalin eingelegt, während die linke Niere schockgefroren und bei -80°C konserviert wurde. Die Milz wurde wiederum in drei Teile geteilt. Der distale Anteil wurde in Formalin gelegt, der mittlere Anteil kurz in flüssigen Stickstoff schock- und danach bei -80°C eingefroren und das proximale Kompartiment zur Bestimmung der Bakterienlast genutzt. Das Zwerchfell wurde zur weiteren Verarbeitung eines angekoppelten Projektes asserviert. Die Lungenspitzen wurden in Formalin gelegt, das restliche Lungengewebe kam in Kryotubes in flüssigen Stickstoff und wurde anschließend bei -80°C konserviert.

2.5 Leukozytenzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl der Mäuse wurde der Zellzähler „Countess II“ verwendet. Blut aus dem retrobulbären Plexus wurde in einem EDTA-Gesäß gesammelt. Bis zur weiteren Verarbeitung stand das Blut auf Eis. Als Puffer wurde ein Eppendorf-Gesäß mit 40 µl „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) gefüllt. Dazu wurden 10 µl des EDTA Blutes aus dem Plexus ophthalmicus der Maus pipettiert, sowie weitere 10 µl Saponin zur Zellyse. Nach einer Lysezeit von einer Minute wurden

weitere 40 µl HBSS hinzugefügt. 10 µl der Lösung wurden in eine Einmal-Zählkammer pipettiert. Weitere 30 s wurde gewartet, bevor die Zählkammer in den Zellzähler Countess II ging. Das Ergebnis des Zellzählers wurde mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 verrechnet.

Diese Methode zur Zählung der Leukozyten wurde mit der bisher bewährten Zählung mit der Neubauer Kammer validiert und ergab einer Varianz unter 10%. Der Zellzähler Countess II zählt vorhandene Zellen in einem Präparat automatisch, sodass keine mikroskopische Untersuchung durch den Untersucher durchgeführt werden muss.

2.6 Plasmaparameter

Zur Bestimmung von Laktat (U/l), Glukose (mg/dl), ALT (U/l), AST (U/l), Kreatinin (mg/dl), Harnstoff (mg/dl) und Bilirubin (mg/dl) im Plasma wurde den Mäusen unter Narkose mit Einmal-Mikropipetten Blut aus dem retrobulbären Venenplexus abgenommen und in einem Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt. Nach der Entnahme wurde das Blut vorsichtig gemischt, um ein Gerinnen zu vermeiden. Nun wurde das entnommene Blut bis zur weiteren Verarbeitung mit Eis gekühlt, um eine weitere Enzymaktivität zu verhindern. Um das Plasma schließlich abpipettieren zu können, wurde das Blut fünf Minuten bei ungefähr 4000 RPM unter Kühlung auf 5°C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma vorsichtig in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und die Parameter schließlich mit dem „Hitachi automatic analyzer“ des Zentrums für medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Mannheim gemessen. Dort wurde das Plasma bei -20°C bis zu sieben Tagen aufbewahrt und in diesem Zeitraum weiterverarbeitet. Zur Bestimmung von ALT und AST wurden jeweils 27 µl benötigt, zur Bestimmung von Kreatinin 7 µl. Die Glukosemessung benötigte 12 µl Plasma, eine Harnstoffbestimmung 8 µl und eine Laktatbestimmung 2 µl. Für Bilirubin wurden 10 µl Plasma verwendet. Außerdem wurde ein Totraumvolumen von 70 µl zur Weiterverarbeitung benötigt.

2.7 Bakterienlast

Die Bakterienlast in Blut und Milz bzw. Leber wurde mit Hilfe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mannheim bestimmt.

2.7.1 Bakterienlast im Blut

Den Versuchstieren wurde jeweils am Ende des Versuches, das heißt nach 6 Stunden, 24 Stunden oder 7 Tagen, Blut aus dem Plexus ophthalmicus mit Einmal-Mikropipetten entnommen und in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen. 10 µl des Blutes wurden mit 90 µl steriler Natriumchloridlösung vermischt und 100 µl des Gemisches wurden auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Die Agarplatten wurden im Institut für Mikrobiologie der UMM bei 37°C 24 +/-2 Stunden bebrütet und dann ausgezählt.

2.7.2 Bakterienlast der Organe

Leber bzw. Milz wurden wie bereits beschrieben (s. 2.6.3) präpariert und je ein Drittel der Organe gewogen. Das Gewebe wurde im Verhältnis 100 mg:1 ml mit steriler Natriumchloridlösung gemischt, durch ein Sieb mit einer Porengröße von 70 µm gepresst und schließlich mit steriler Salzlösung in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Im Anschluss daran wurden sowohl von der Leber als auch von der Milz je 100 µl auf zwei Agarplatten unter einem Abzug aufgetragen, um mögliche Verunreinigungen zu minimieren. Die Agarplatten wurden wiederum im Institut für Mikrobiologie bei 37°C 24 +/-2 Stunden bebrütet und dann ausgezählt.

2.8 Zytokine

In dem entnommenen EDTA-Plasma wurden mit dem „Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel“ 32 verschiedene Zytokine bestimmt: Eotaxin/CCL11, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IP-10/CXCL10, KC/GROα/CXCL1, LIF, LIX, MCP-1/CCL2, M-CSF, MIG/CXCL9, MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4, MIP-2/CXCL2, RANTES/CCL5, TNF-α, VEGF-A. Für die Messung wurde ein Teil des Blutes in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen und dieses sofort eisgekühlt. Es wurde daraufhin 10 Minuten bei 1000xg zentrifugiert und ca. 50 µl Plasma abpipettiert, die wiederum bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt wurden.

Nachdem alle Proben vorhanden waren, wurden diese aufgetaut, gemäß dem Protokoll des Herstellers aufbereitet und auf das Panel aufgetragen. Mittels Immunoassays wurden schließlich die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine in den Proben gemessen.

2.9 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur und die Bewegung der Mäuse wurde mithilfe einer „Flir A655sc“ Infrarotkamera mit einer 45° Linse und 3 Frames pro Sekunde gemessen. Sie wurde vor jeder Versuchsreihe am Abend vor den Injektionen über dem Käfig montiert, nachdem die Mäuse in ihren separaten Versuchsraum (S2-Labor) gebracht wurden. Die Käfige durften dafür nur von dem Metallgitter abgedeckt sein, der Deckel der Käfige wurde abgenommen, sodass lediglich ein Metalldeckel dem Käfig auflag. Das Futter der Mäuse wurde auf den Käfigboden gelegt, um das Kamerabild nicht zu verfälschen. Zur Kontrolle begann die Aufnahme bereits 24 Stunden vor den ersten Injektionen. Nach jedem Scoring und jeder Antibiotikadosis wurden die Versuchstiere in den Käfig zurückgesetzt und deren Identifikationsnummer mit den Fingern in die Kamera gezeigt. Die Körpertemperatur wurde alle 16 Stunden mit der „Flir ResearchIR Max software Version 4.40.9“ ausgelesen. Das Konzept beruhte auf Tungtur et al. mit wenigen Veränderungen (Tungtur et al., 2017).

2.10 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in Microsoft Excel 2017 (Microsoft, Redmond, USA) erfasst und anschließend mit Graph Pad Prism Version 8.4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Normalverteilung bzw. logarithmische Normalverteilung der erhobenen Parameter wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Normalverteilte Daten wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Tukey Post-Hoc-Test überprüft. Daten mit logarithmischer Normalverteilung wurden nach logarithmischer Transformation ebenfalls mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Tukey Post-Hoc-Test ausgewertet. Daten ohne Normalverteilung wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn`s Post-Hoc-Test ausgewertet. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Korrelationen zwischen Bakterienlast, Zytokinen und Scores wurde anhand des Pearson-Korrelationskoeffizient r und dem Spearman-Koeffizienten r für nicht-normalverteilte Variablen berechnet. Zum Vergleich der Korrelationen wurde der Chi-Square-Test verwendet. Deskriptive Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. Median (Interquartilsabstand) angegeben. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bakterienlast im CS

Die Auswertung des CS direkt nach Herstellung bzw. nach 24 Stunden Schockfrieren ergab die in Tabelle 4 dargestellten mikrobiologischen Befunde.

Tabelle 4: Bakterienlast des frischen CS (10.04.18) und des gefrorenen CS (11.04.18)

	10.04.18	11.04.18
Staphylococcus aureus	5×10^4	$5,6 \times 10^4$
Escherichia coli	1×10^4	
Staphylococcus sciuri	$1,9 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
Enterococcus faecalis	$2,5 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$
Microbacterium spp.	1×10^3	
Lactobacillus spp.	$2,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Parabacteroides godsteinii	$2,8 \times 10^6$	
Staphylococcus spp.	1×10^4	
Staphylococcus capitis	1×10^5	
Staphylococcus hämolyticus	1×10^5	
Brevundimonas diminuta		1×10^3
Rhodococcus equi		1×10^3
Rothia spp.		1×10^5
Streptococcus oralis		2×10^5
Staphylococcus hominis		2×10^5

3.2 Versuchsteil I - Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs

3.2.1 Einfluss von CS-Dosis, Beginn und Dosierungsintervall der Antibiotikatherapie

Der Ausgangswert des MSS war bei allen Versuchstieren null. Bei einer CS-Injektion von 100 µl bzw. 150 µl konnten bereits nach 48 bzw. 72 Stunden anhand des MSS keine klinischen Symptome mehr festgestellt werden. Sobald die Dosis jedoch auf 175 µl erhöht wurde, war die Ausfallrate 100% innerhalb der ersten zwei bis drei Tage. Alle Versuchstiere verstarben im Versuch. Bei dem Vergleich verschiedener CS-Dosierungen zeigten sich also maximale Ausfallraten bei der 175 µl- und der 200 µl-Gruppe (**Abbildung 3**).

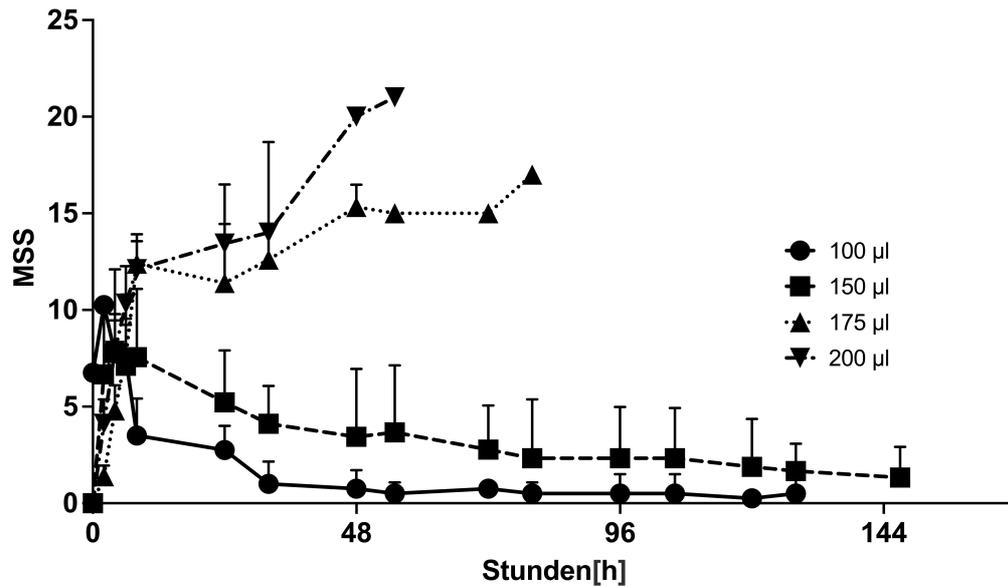


Abbildung 3: MSS in Abhängigkeit aufsteigender CS-Dosierungen, n=5 für die 100µl- und die 175µl-Gruppe und n=10 für die 150µl- und die 200µl-Gruppe zu Beginn der Versuche pro Gruppe (MW ±SE)

Um eine Ausfallsrate zu finden, die der Mortalität des Patienten mit humaner Sepsis ähnelt (ca. 17 – 26%), wurde versucht einen „second hit“ im Sinne einer zweiten CS-Injektion in der 150 µl -Gruppe nach 48 Stunden darzustellen (Fleischmann et al., 2016; SepNet Critical Care Trials, 2016). Bei einer zweiten Injektion von 150 µl zeigte sich eine geringgradige Zunahme der Symptomschwere, doch nach einem weiteren Tag konnten keine nennenswerten Symptome anhand des MSS mehr festgestellt werden (**Abbildung 4**). Bei einem „second hit“ mit 175 µl zeigte sich eine Mortalität von 100% (**Abbildung 5**).

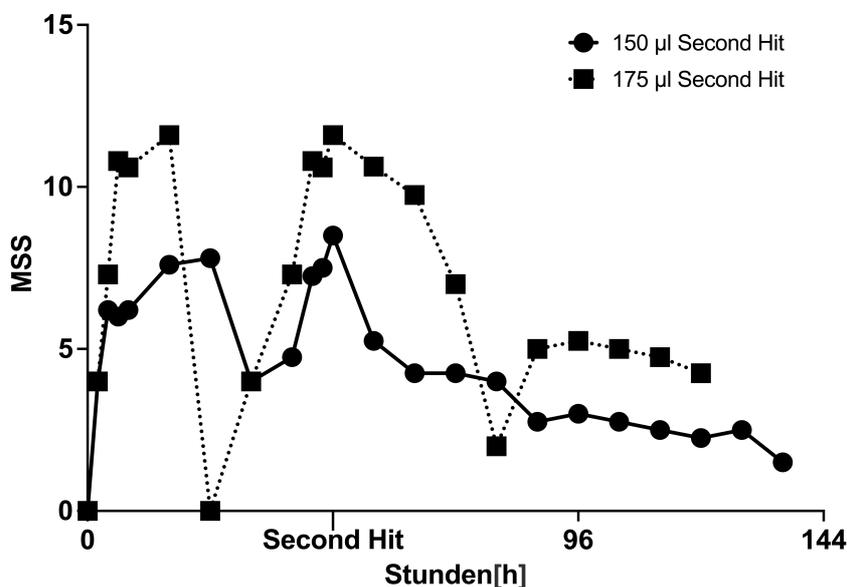


Abbildung 4: MSS bei „second hit“ mit n=5 zu Beginn der Versuche pro Gruppe

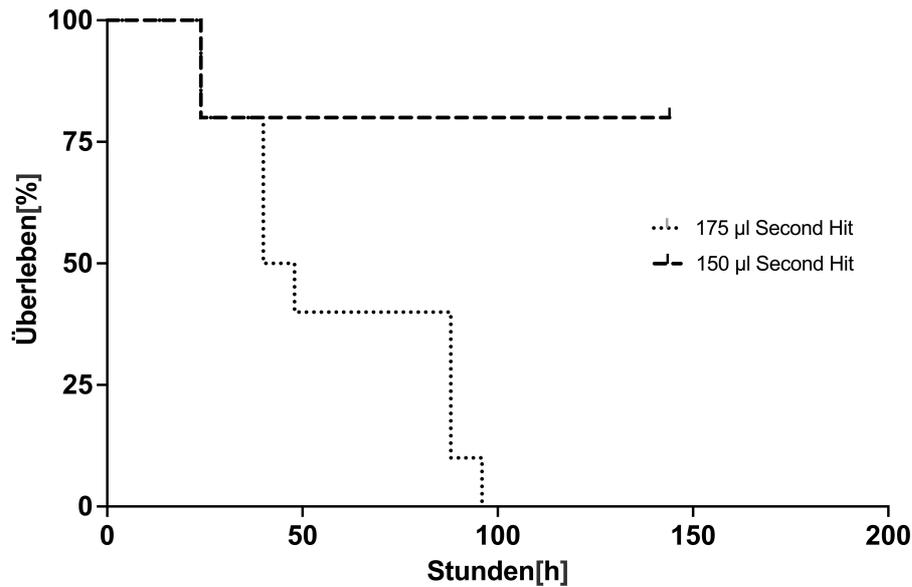


Abbildung 5: Überlebensrate nach „second hit“ mit n=5 zu Beginn der Versuche pro Gruppe

Eine weitere Möglichkeit die angestrebte Mortalitätsrate im CS-Modell zu erreichen, bestand in der Therapie mit einem Breitspektrumantibiotikum. Eine CS-Injektion von 175 µl mit nach zehn Stunden folgender Therapie mit 300 µl, 5mg/ml Imipenem und 400 µl steriler Salzlösung s.c. nach der Sepsisinduktion und eine Wiederholung dieser Therapie alle 12 Stunden führte zu einer Ausfallsrate von 0%. Außerdem erholten sich die überlebenden Tiere sehr schnell und ein septisches Krankheitsbild anhand des MSS war nicht mehr detektierbar. Bei einer Erhöhung der initialen CS-Dosis auf 200 µl und einer ersten Behandlung nach acht bzw. zehn Stunden mit einer Wiederholung alle 12 Stunden, überlebten ebenfalls alle Versuchstiere, obwohl 200 µl CS ohne Antibiotikatherapie zu einer 100%igen Mortalität führte. Schließlich konnten wir eine Mortalitätsrate von 25% generieren bei einer CS-Injektion von 200 µl, einer Erstgabe von Antibiotikum und Flüssigkeit nach zehn Stunden und eine Wiederholung alle 16 Stunden. Bei einem Behandlungsintervall von 16 Stunden wurde ein prolongierter Krankheitsverlauf erzielt, während bei einem Intervall von 12 Stunden nach ungefähr eineinhalb Tagen wieder ein MSS von unter 9 erreicht wurde (**Abbildung 6**).

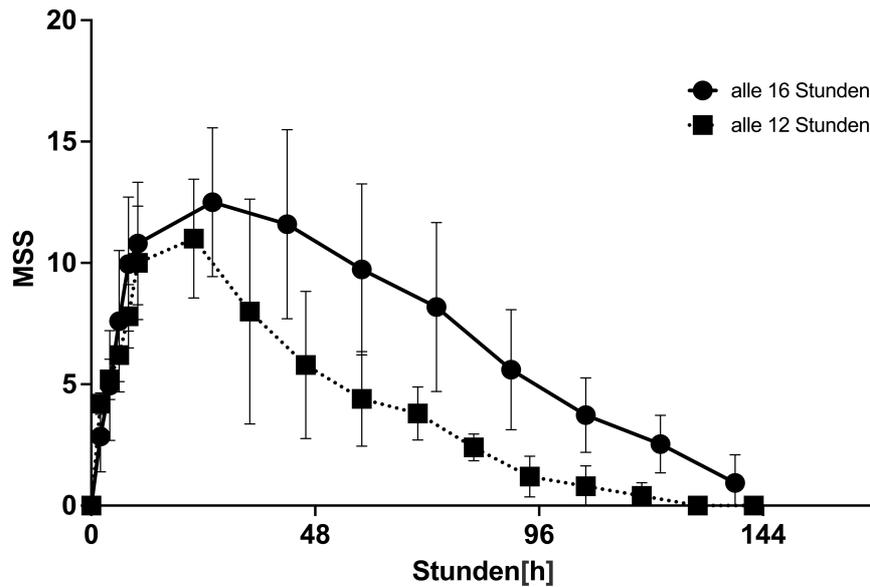


Abbildung 6: Sepsis Score über 7 Tage, Vergleich des Antibiotikaintervall alle 12h vs. 16h mit n=5 für die Gruppe mit Wiederholung alle 12 Stunden und n=10 für die Gruppe mit Wiederholung alle 16 Stunden zu Beginn der Versuche pro Gruppe

Eine weitere Möglichkeit, um die Erkrankungsschwere länger im mittleren Ausmaß zu halten, war die Injektion einer nochmals erhöhten CS-Dosis zu Beginn. Bei einer Dosis von 250 µl zeigten sich allerdings deutlich höhere Ausfallraten, sodass nur ein Versuchstier von fünf überlebte.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Versuchsteil I (Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs-Effekt der CS-Dosis und Beginn sowie des Dosierungsintervalls der Antibiose) geben die **Abbildung 7** und **Tabelle 5** wieder. Es bestätigte sich wiederholt, dass eine CS-Dosis von 200 µl ohne Behandlung mit einer Ausfallrate von 100% als letale Dosis gilt. Durch eine Antibiotikatherapie kann die Mortalität in Abhängigkeit des Zeitpunkts des Beginns der Behandlung und der Dauer des Zeitintervalls bis zu einer Behandlungswiederholung eingestellt werden.

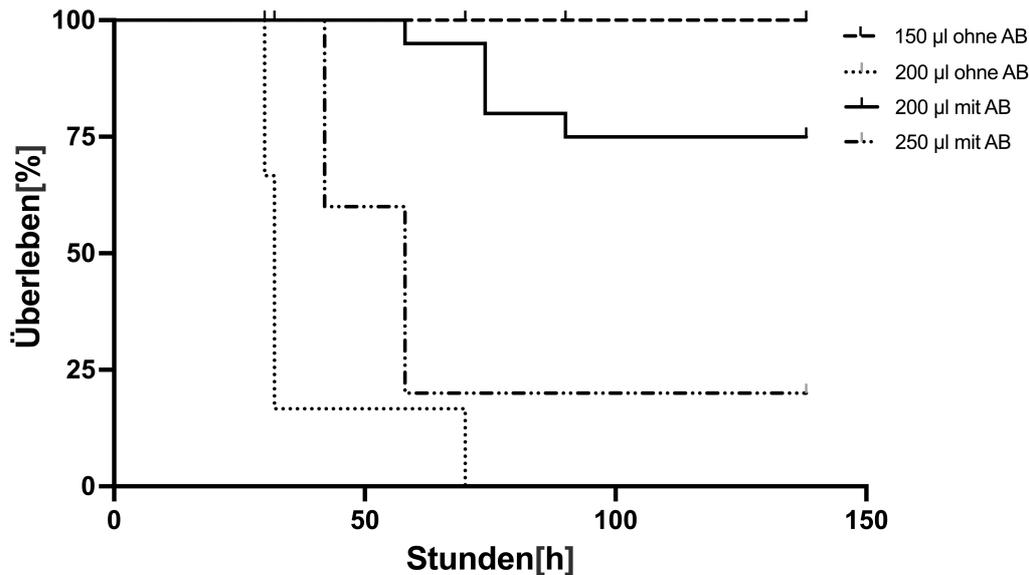


Abbildung 7: Vergleich verschiedener CS-Dosierungen und (mit und ohne) Behandlungen mit n=10 für die 150µl- und 200µl-Gruppen, für die 250µl-Gruppe ist n=5 zu Beginn der Versuche pro Gruppe

Tabelle 5: Mortalität der 7-Tage-Gruppen mit verschiedenen CS-Dosierungen und Behandlungen mit n=5 für die 100µl-, 175µl-Gruppe, die second-hit-Gruppe mit 150µl, die 175µl+AB 6h nach CS alle 12h- und die 250µl+AB 10h nach CS alle 16h-Gruppe, sowie die 200µl+AB 8h nach CS alle 12h- und die 200µl+AB 10h nach CS alle 12h-Gruppe; n=10 für die 150µl- die 200µl-Gruppe und die second hit-Gruppe mit 175µl und n= 20 für die 200µl+AB 10h nach CS alle 16h-Gruppe zu Beginn der Versuche

<u>Versuchsteil I</u>	
CS – ohne Antibiose	Mortalität
100µl	0%
150µl	0%
175µl	100%
200µl	100%
second hit	
150µl	20%
175µl	100%
CS – mit Antibiose/ Einfluss von Therapiebeginn und Dosierungsintervall	Mortalität
175µl+AB 10h nach CS alle 12h	0%
200µl+AB 8h nach CS alle 12h	0%
200µl+AB 10h nach CS alle 12h	0%
200µl+AB 10h nach CS alle 16h	25%
250ul+AB 10h nach CS alle 16h	80%

3.3 Versuchsteil II - Charakterisierung des Modells

Für die nachfolgenden Ergebnisse (s. 3.3.1-3.3.5) wurden 40 männliche Versuchstiere im Alter von 12 +/- 2 Wochen in einem Zeitraum vom 15.04.2019 bis zum 17.09.2019 untersucht. Die Induktion der Sepsis erfolgte stets mit 200 µl CS, eine Therapie fand erstmals nach 10 Stunden mit 300 µl Imipenem (5mg/ml) und 400 µl sterile NaCl 0,9 % Lösung statt und wurde alle 16 Stunden mit derselben Antibiotika-/Volumentherapie wiederholt. Alle acht Stunden fand außerdem die Erhebung des Scores, sowie die Therapie mit Buprenorphin 0,1 mg/kg KG statt.

3.3.1 MSS und Mortalität

7-Tage-Gruppe

Nach der Injektion mit CS zeigte der MSS den steilsten Anstieg bis zur ersten Antibiotikagabe nach 10 Stunden auf einen durchschnittlichen Wert von $11,1 \pm 3,14$. Als Spitzenwert konnte der MSS von $13,1 \pm 2,88$ detektiert werden, der nach 16 Stunden bei der nächsten Antibiotikagabe erhoben wurde. Nach Erreichen des Peaks fiel der MSS kontinuierlich ab bis zu einem Endwert von $0,25 \pm 0,46$ (**Abbildung 8**).

In **Abbildung 9** sieht man eine deutlich höhere Überlebensrate von 75% bei der Therapie mit Antibiose (300 µl, 5mg/ml Imipenem) und der Gabe von 400 µl sterile Infusionslösung Flüssigkeit. Diese Therapie erfolgte erstmalig 10 Stunden nach CS-Injektion und einer Wiederholung alle 16 Stunden. Ohne diese etablierte Therapie ergab sich eine Mortalität von 100%. **Abbildung 10** zeigt den Verlauf des MSS nach CS-Injektion im Vergleich zwischen mit und ohne Antibiose behandelter Tiere.

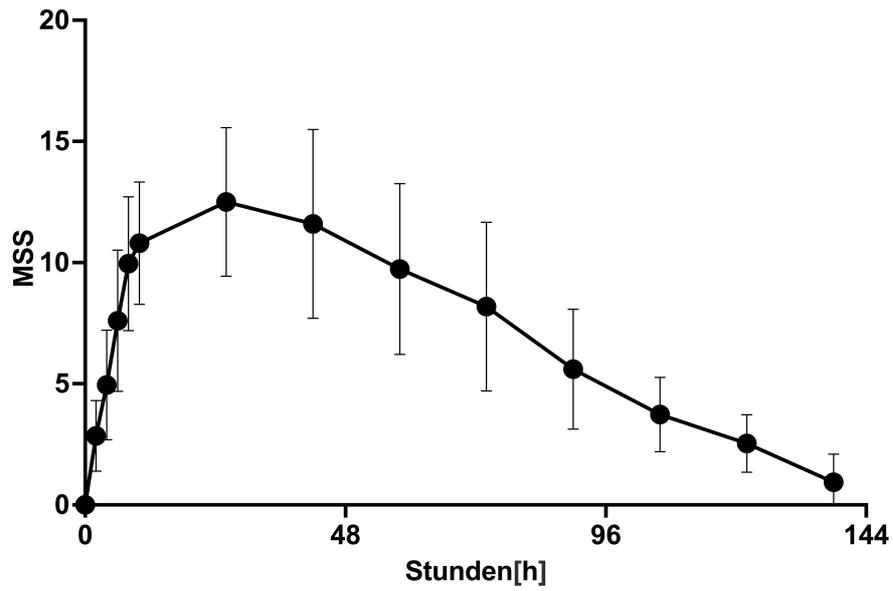


Abbildung 8: MSS über 7 Tage n=20 zu Beginn der Versuche

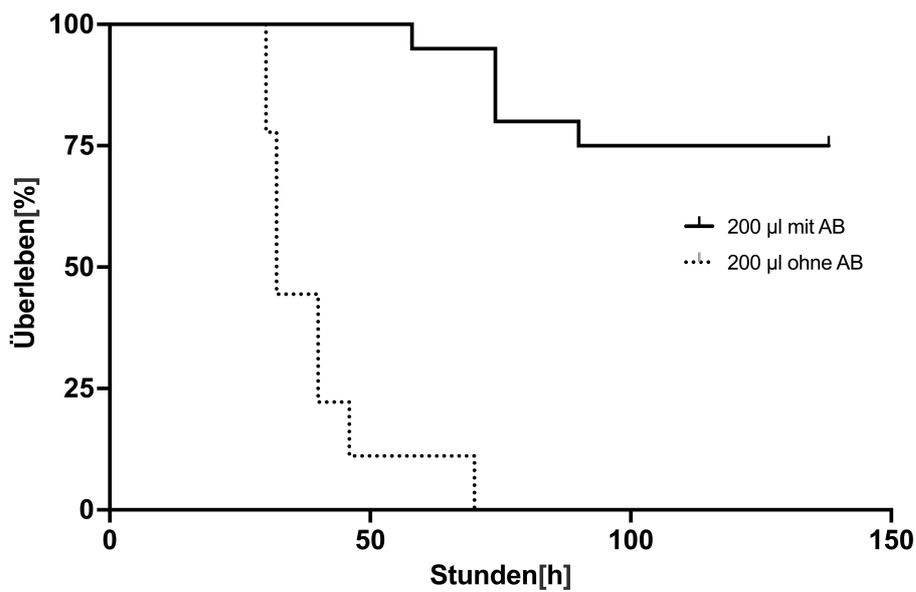


Abbildung 9: Überlebensrate der 200 µl-Dosis ohne und mit Therapie n=10 pro Gruppe zu Beginn des Versuches

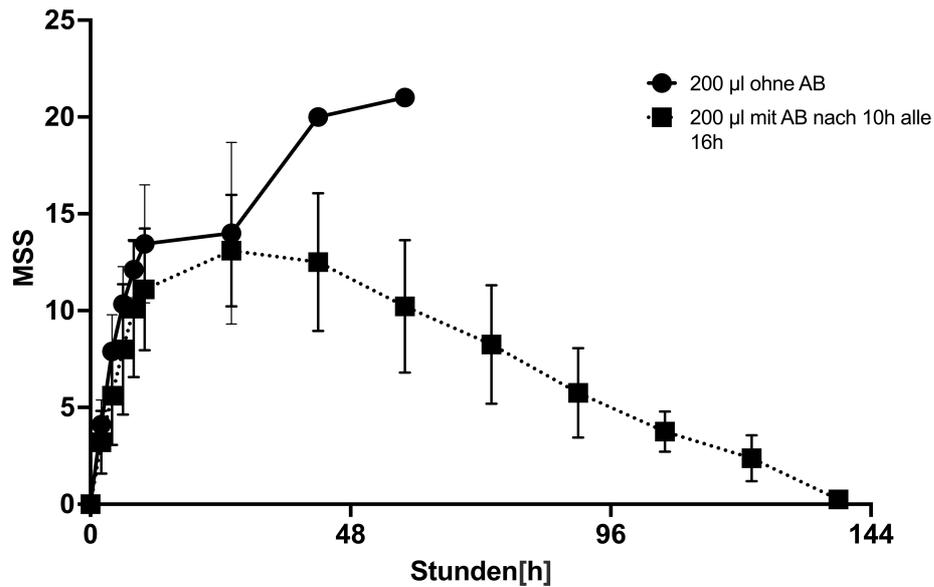


Abbildung 10: MSS der 200 µl-Dosis ohne und mit Therapie mit n=10 pro Gruppe zu Beginn der Versuche

6-Stunden-Gruppe

In der 6-Stunden-Gruppe stieg der Score bis zum Zeitpunkt der Präparation kontinuierlich an auf einen Mittelwert von $8,50 \pm 4,22$.

24-Stunden-Gruppe

Bis zum Zeitpunkt der ersten Antibiotikagabe zeigte sich ein Anstieg auf einen Mittelwert von $10,10 \pm 3,96$. Nach 24 Stunden war der Wert trotz Antibiotikagabe weiter angestiegen auf $12,00 \pm 5,03$.

24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose

In der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiotikagabe zeigten sich ab einem Zeitpunkt von 20 Stunden deutlich höhere Werte mit einem maximalen Mittelwert von $15,56 \pm 3$ und vom klinischen Eindruck weiter steigenden jedoch nicht dokumentierten Werten. Außerdem zeigte sich eine Ausfallsrate von 10%.

3.3.2 Bakterienlast im Blut

Die Bakterienlast in der 6-Stunden-Gruppe war mit ca. 135 Kolonien pro 10 µl Blut signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,0026$). Die erste Antibiose-Therapie (nach 10 Stunden) konnte den Anstieg der Bakterienlast im Blut zum Zeitpunkt 24

Stunden nach CS-Injektion verhindern (kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe). In der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose stieg die Bakterienlast im Blut gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an ($p=0,0004$). Ansonsten zeigten sich bezüglich der Bakterienlast im Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (**Abbildung 11**).

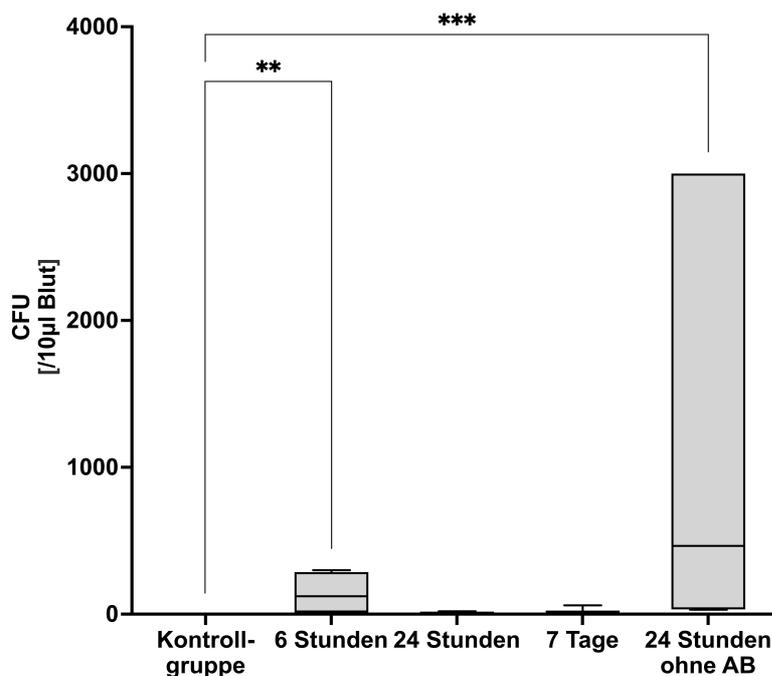


Abbildung 11: Bakterienlast im Blut mit $**=p \leq 0,01$ und $***=p \leq 0,001$ und $n=10$ zu Beginn des Versuchs

3.3.2.1 Korrelationen zwischen der Bakterienlast im Blut mit dem MSS in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

In der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose bestand keine Korrelation zwischen der Bakterienlast und dem MSS, während in der unbehandelten 24-Stunden-Gruppe die Bakterienlast im Blut und signifikant mit dem MSS korrelierte ($r=0,8017$; $p=0,0047$).

3.3.3 Bakterienlast in der Leber

Die Bakterienlast in der Leber war, sowohl in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0455$) als auch in der 24-Stunden-Gruppe mit und ohne Antibiose signifikant höher ($p=0,004$ bzw. $<0,0001$) als in der Kontrollgruppe. Ein signifikantes Ergebnis im Vergleich der 7-Tage- mit der Kontrollgruppe zeigte sich nicht. Des Weiteren war die Bakterienlast in

der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose signifikant höher als die der 7-Tage-Gruppe ($p=0,0419$).

Die erste Antibiotikatherapie (nach 10 Stunden) konnte den Anstieg der Bakterienlast in der Leber im Gegensatz zum Blut zum Zeitpunkt 24 Stunden nach CS-Injektion nicht verhindern (**Abbildung 12**).

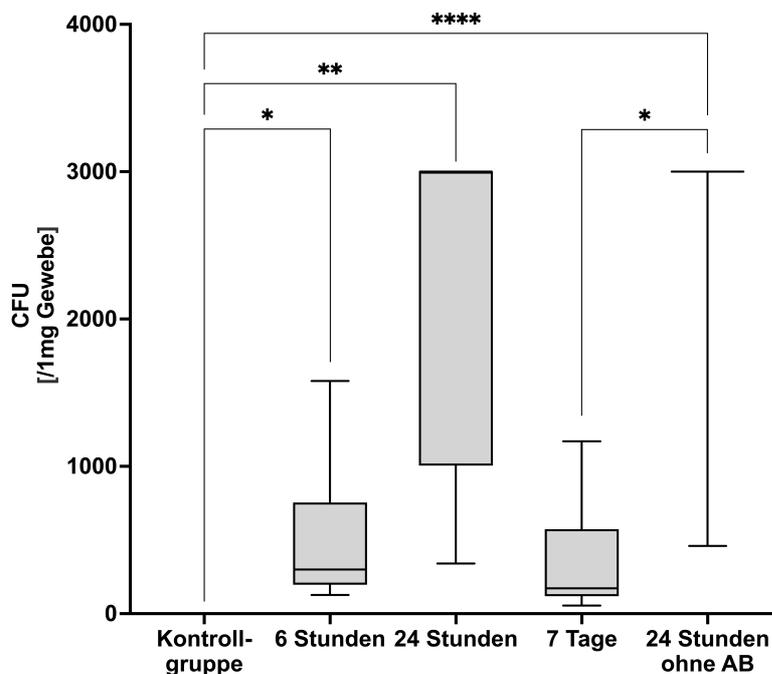


Abbildung 12: Bakterienlast in der Leber mit $*=p < 0,05$, $**=p \leq 0,01$ und $****=p \leq 0,0001$ und $n=10$ zu Beginn des Versuchs

3.3.3.1 Korrelationen zwischen der Bakterienlast in der Leber mit dem MSS in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

In der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose ergab sich trotz des Anstiegs der Bakterienlast keine Korrelation zum MSS. Es zeigte sich jedoch wie im Blut erneut eine positive Korrelation zwischen der Bakterienlast in der Leber in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose mit dem MSS ($r=0,6703$; $p=0,0241$).

3.3.4 Bakterienlast in der Milz

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0248$), die 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0139$), die 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p<0,0001$) und die 7-Tage-Gruppe ($p=0,0316$) eine signifikant höhere Bakterienlast in der Milz. Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Die erste Antibiotikatherapie (nach 10 Stunden) hatte zum Zeitpunkt 24 Stunden wie für die Leber beobachtet ebenfalls keinen Einfluss auf die Bakterienlast in der Milz (**Abbildung 13**).

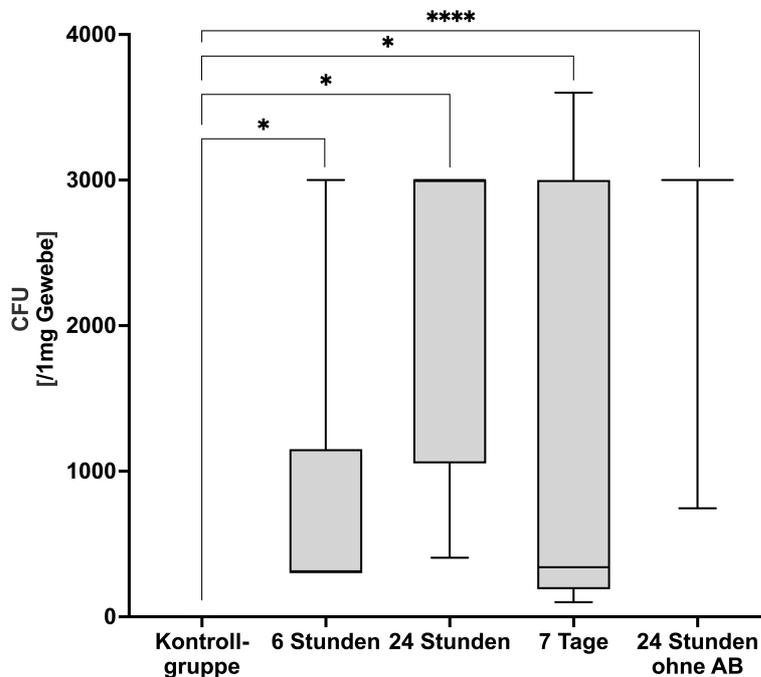


Abbildung 13: Bakterienlast in der Milz mit $*=p < 0,05$ und $****=p \leq 0,0001$ und $n=10$ zu Beginn des Versuchs

3.3.4.1 Korrelationen zwischen der Bakterienlast in der Milz mit dem MSS in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen der Bakterienlast in der Milz mit dem „Murine Sepsis Score“, weder bei den mit noch den ohne Antibiotika behandelten Tieren.

3.3.5 Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahl im Blut blieb gegenüber den Werten der Kontrollgruppe mit Ausnahme der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose unverändert. Die Werte der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose waren auch gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht (**Abbildung 14**). Die Leukozytenzahl lag in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose bei durchschnittlich $36,73 \times 10^3/\text{mm}^3$, allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung von $29,92 \times 10^3/\text{mm}^3$.

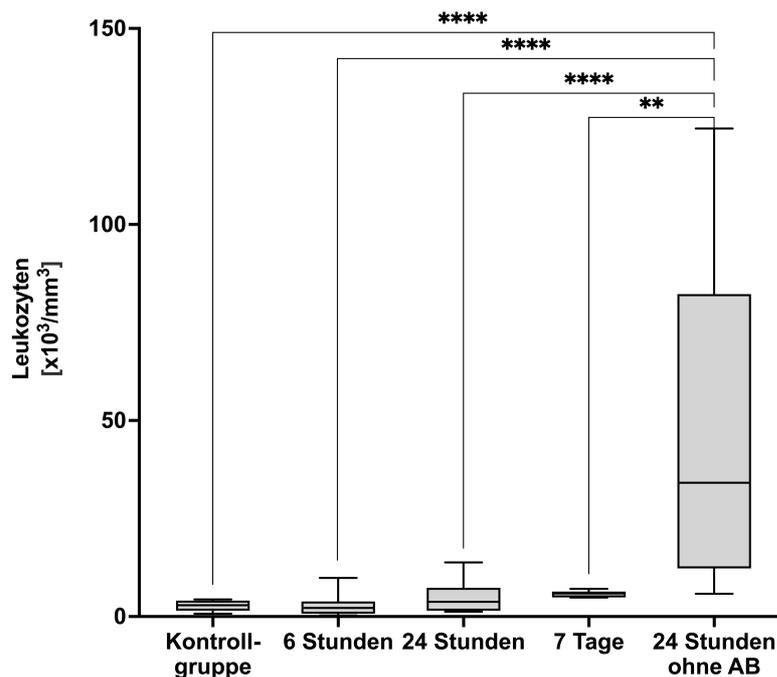


Abbildung 14: Leukozytenzahlen mit $**=p \leq 0,01$ und $****=p \leq 0,0001$ und $n=10$ zu Beginn des Versuchs

3.3.5.1 Korrelation zwischen Leukozyten im Blut mit dem MSS in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

Es bestanden keine Korrelationen zwischen den Leukozytenzahlen im Blut mit dem MSS in den beiden 24-Stunden-Gruppen.

3.3.6 Plasmaparameter

Im Plasma der Versuchstiere wurden Laktat, Glukose, ALT, AST, Harnstoff und Kreatinin bestimmt.

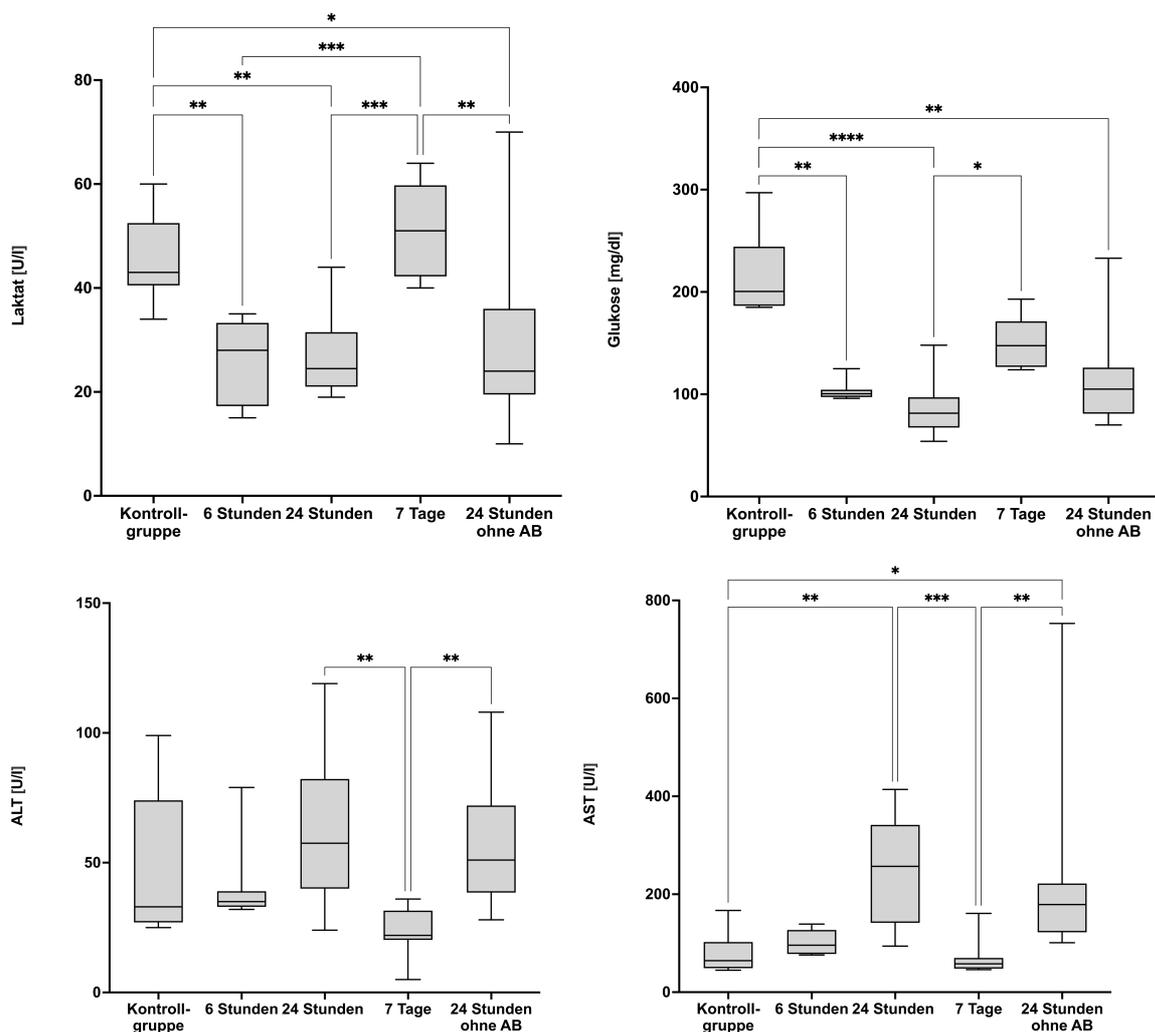
Bezüglich der Laktatkonzentration im Plasma zeigte sich bei Prüfung mit dem Tukey multiple comparison-Test ein signifikanter Abfall zwischen der Kontrollgruppe ($1,651 \pm 0,07539$ mmol/l), der 6-Stunden-Gruppe ($1,399 \pm 0,149$ mmol/l), der 24-Stunden-Gruppe ($1,419 \pm 0,120$ mmol/l) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($1,413 \pm 0,2358$ U/l; jeweils $p < 0,0068$). Für den Vergleich zwischen der Kontroll- und der 7-Tage-Gruppe ($1,702 \pm 0,075$ mmol/l) lag kein signifikantes Ergebnis vor.

Hinsichtlich der Glukose im Plasma zeigte sich ebenfalls signifikant höhere Werte in der Kontrollgruppe ($2,334 \pm 0,078$ mg/dl) gegenüber jeder anderen Gruppe ($p < 0,0001$). Die 7-Tage-Gruppe ($2,173 \pm 0,070$ mg/dl) zeigte signifikant erhöhte

Blutglukose-Werte gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($2,012 \pm 0,037$ mg/dl; $p < 0,035$) und gegenüber der 24-Stunden-Gruppe ($1,913 \pm 0,134$ mg/dl; $p < 0,0001$).

Die ALT zeigte einen signifikanten Abfall bei dem Vergleich der 7-Tage-Gruppe ($23,00 \pm 9,49$ U/l) mit der 24-Stunden-Gruppe ($62,90 \pm 32,04$ U/l; $p = 0,0032$) und bei dem Vergleich mit der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($57,44 \pm 24,55$ U/l; $p = 0,0081$) auf. Bei der AST zeigte die Kontrollgruppe ($1,854 \pm 0,185$ U/l) gegenüber der 24-Stunden-Gruppe ($2,341 \pm 0,221$ U/l; $p < 0,0001$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($2,269 \pm 0,260$ U/l; $p = 0,0005$) signifikant niedrigere Werte. Außerdem war die AST in der 24-Stunden-Gruppe im Vergleich zu der 6-Stunden-Gruppe ($2,001 \pm 0,107$ U/l; $p = 0,012$) und der 7-Tage-Gruppe ($1,806 \pm 0,176$ U/l; $p < 0,0001$) signifikant höher. Auch die 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose unterschied sich signifikant von der 7-Tage-Gruppe ($p = 0,0002$).

Die Retentionsparameter Harnstoff und Kreatinin zeigten in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede (**Abbildung 15**).



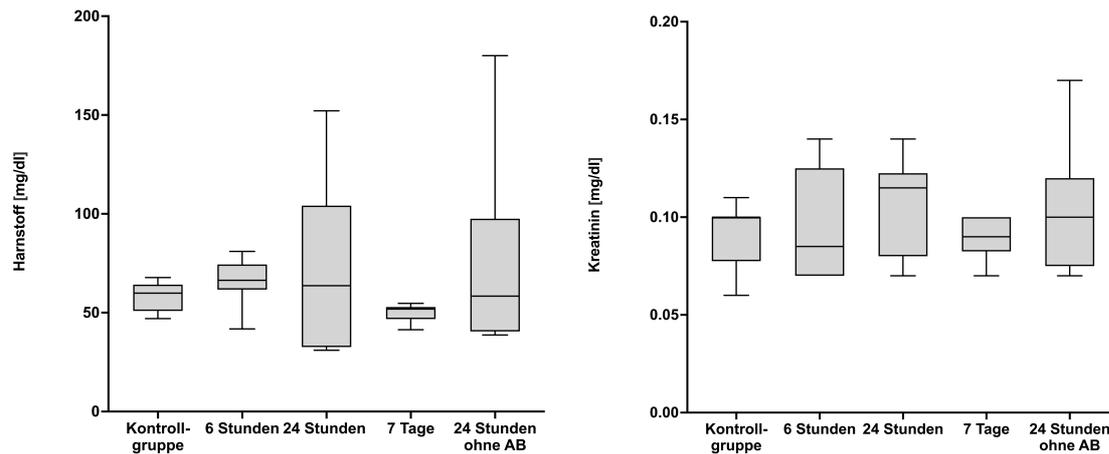


Abbildung 15: Laktat, Glukose, ALT, AST, Harnstoff, Kreatinin im Plasma jeweils mit n=10 zu Beginn der Versuche pro Gruppe und $*=p < 0,05$, $**=p \leq 0,01$, $***=p \leq 0,001$, $****=p \leq 0,0001$

In der 6-Stunden-Gruppe zeigte sich ein De-Ritis-Quotient (AST/ALT) von 2,6, was bereits für einen schweren Leberschaden spricht. Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein De-Ritis-Quotient von 1,61 in der Kontrollgruppe. Sowohl in der 24-Stunden-Gruppe (4,15) als auch in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose (3,94) zeigte sich eine weitere Steigerung des Quotienten. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose und der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$), sowie zwischen der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose und der Kontrollgruppe ($p = 0,0013$). Selbst in der 7-Tage-Gruppe zeigte sich weiterhin trotz Antibiose ein deutlich erhöhter De-Ritis-Quotient mit 3,99.

3.3.7 Zytokine

Die 32 verschiedenen Zytokine sind nachfolgend in pro- und antiinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Chemokine unterteilt. Diese Einteilung trennt nicht konsequent, da viele Zytokine multiple und überlappende Funktionen ausüben. Mit dem „Kruskal-Wallis-Test“ und dem „Dunn`s multiple comparisons-Test“ wurden jeweils alle Tierversuchsgruppen für jedes Zytokin miteinander verglichen (**Tabellen 6, 7, 8**).

3.3.7.1 Veränderungen der proinflammatorischen Zytokine

Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählen: IL-1a und b, TNF- α , IL-6, LIF, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-2, IL-15, IFN- γ und IL-17. Darunter werden als TH1-Zytokine TNF- α , IL-2 sowie IFN- γ subsummiert, welche ebenso wie das TH17-Zytokin IL-17 bei der Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen eine prominente Rolle spielen. Interleukin-1a, produziert z.B. von Makrophagen, zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,0005$). Ebenso verhielt es sich in der 24-Stunden-Gruppe (mit Antibiose) gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,0188$) und in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0224$). Kein signifikanter Unterschied bezüglich des IL-1a-Wertes zeigte sich im Vergleich der Kontrollgruppe mit der 7-Tage-Gruppe. Die 6-Stunden-Gruppe gegenüber der 24-Stunden-Gruppe unabhängig von der Antibiotikagabe zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Signifikant niedrigere Werte zeigten sich im Vergleich der 7-Tage-Gruppe mit der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,001$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0262$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0307$).

Bezüglich IL-1b, produziert z.B. von Monozyten im Blut, zeigten sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Kontrollgruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($p<0,0001$) und gegenüber der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,006$). Außerdem war IL-1b signifikant niedriger in der 7-Tage-Gruppe verglichen mit der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0019$).

Bezüglich TNF- α , welches hauptsächlich in Makrophagen und auch T-Zellen gebildet wird, sieht man gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0002$), in der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0122$) und in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0042$). Außerdem zeigte sich ein niedrigerer Wert in der 7-Tage-Gruppe verglichen mit der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0062$).

IL-6, ein pleiotropes, die Akutphaseproteine-induzierendes Zytokin, produziert z.B. ebenfalls von Makrophagen, war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher in der 6-Stunden-Gruppe ($p<0,0001$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0114$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0092$). Außerdem war IL-6 in der 7-Tage-Gruppe signifikant niedriger als in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0295$).

LIF, der Lymphozyten-inhibierender Faktor, zählt auch zur Familie der IL-6 Zytokine. LIF zeigte signifikante Unterschiede bei dem Vergleich der Kontrollgruppe mit der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0012$) und der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0315$).

IL-12(p40), gebildet von Makrophagen und dendritischen Zellen, zeigte im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe auf ($p < 0,0001$) und einen signifikanten Abfall in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($p = 0,0018$). Bei IL-12(p70) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($p < 0,0001$), der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p = 0,0270$) und der 7-Tage-Gruppe ($p = 0,0047$).

Interleukin-2, welches auto-/parakrin von T-Lymphozyten produziert wird und deren Proliferation stimuliert, stieg im Vergleich zu der Kontrollgruppe lediglich in der 6-Stunden-Gruppe ($p = 0,0003$) und in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p = 0,0256$) signifikant an.

Interleukin-15, welches von monozytären/phagozytären Zellen produziert wird und die Proliferation von NK-Zellen stimuliert, steigt im Vergleich zur Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe signifikant an ($p = 0,0006$).

IFN- γ , ein von NK-, NKT-Zellen und Lymphozyten produziertes Typ-II-Interferon mit starkem „priming effect“ auf die Effektorfunktionen von Phagozyten, war in der 6-Stunden-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,0005$).

IL-17 wird produziert von T-Zellen, es wirkt auf Monozyten und Neutrophile chemotaktisch und trägt hierdurch maßgeblich zu einer proinflammatorischen Antwort bei. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte es einen signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe ($p < 0,0001$), der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p = 0,0030$) und der 7-Tage-Gruppe ($p = 0,0338$).

Zusammenfassend ließ sich durch den Wilcoxon signed rank-Test mit einem 5%-Signifikanzlevel bestätigen, dass die meisten proinflammatorischen Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ansteigen in der 7-Tage-Gruppe ($p = 0,0156$) wieder abzusinken.

Tabelle 6: Proinflammatorische Zytokine: Es gilt n=10 für die Kontrollgruppe und n=7 für die restlichen Gruppen. Es handelt sich um den Mittelwert +/- Standardabweichung, mit *=p < 0,05, **=p ≤ 0,01, ***=p ≤ 0,001, ****=p ≤ 0,0001 gegenüber der Kontrollgruppe, #=p < 0,05, ##=p ≤ 0,01, ###=p ≤ 0,001 gegenüber der 6 Stunden-Gruppe.

Zytokin (pg/ml)	Kontrollgruppe	6 Stunden	24 Stunden	7 Tage	24 Stunden ohne AB
IL-1 α	26.46 ± 17.63	341.3 ± 109.7 ***	259 ± 126.8 *	24.31 ± 23.27 ###	260 ± 103.8 *
IL-1 β	0 ± 0	55.77 ± 15.77 ****	25.41 ± 18.39	1.607 ± 3.097 ##	38.37 ± 36.32 **
TNF- α	2.102 ± 4.558	172.9 ± 47.25 ***	112.7 ± 85.51 *	8.186 ± 10.41	150.7 ± 142.0 **
IL-6	6.43 ± 11.50	48380 ± 14961 ****	13800 ± 18880 *	159.4 ± 79.08 #	16156 ± 20710 **
LIF	0 ± 0	62.51 ± 27.08 **	124.6 ± 170.2 *	6.894 ± 7.274	168.2 ± 349.1
IL-12 (p40)	0 ± 0	82.81 ± 18.98 ****	41.87 ± 29.70	5.846 ± 15.47 ##	44.28 ± 41.28
IL-12 (p70)	5.433 ± 1.929	180.3 ± 56.40 ***	86.22 ± 64.03	309.9 ± 344.0 **	110 ± 81.52 *
IL-2	0 ± 0	49.04 ± 11.39 ***	25.06 ± 17.45	58.01 ± 110.2	34.94 ± 31.16 *
IL-15	41.17 ± 93.36	415 ± 127.3 ***	238.8 ± 177.4	175.3 ± 167.4	387.3 ± 359.4 *
IFN- γ	0 ± 0	40.26 ± 18.4 ***	19.08 ± 21.63	51.62 ± 100.4	23.39 ± 27.02
IL-17	0 ± 0	218.2 ± 194.1 ****	32.96 ± 36.16	50.41 ± 46.18 *	863.3 ± 1872 **

3.3.7.2 Veränderungen der antiinflammatorischen Zytokine

Die antiinflammatorischen Zytokine beinhalten: IL-4, IL-5, IL-10 und IL13. Darunter gehören die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu den Th2 Zytokinen, welche für eine humorale bzw. Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten, Allergene und Toxine notwendig sind. IL-4 zeigte einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe in der 7-Tage-Gruppe (p=0,0375)

IL-5 stieg gegenüber der Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ($p < 0,0001$) und ebenfalls in der 7-Tage-Gruppe ($p = 0,0005$) an.

IL-10 wies signifikante Unterschiede bei Vergleich der Kontrollgruppe mit der 6-Stunden-Gruppe ($p = 0,0005$), der 24-Stunden-Gruppe ($p = 0,0007$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p = 0,0032$) auf.

Bei IL-13 zeigten sich signifikante Anstiege in der 6-Stunden-Gruppe ($p = 0,0004$) und der 24-Stunden-Gruppe ($p = 0,0307$).

Tabelle 7: Antiinflammatorische Zytokine: Es gilt $n=10$ für die Kontrollgruppe und $n=7$ für die restlichen Gruppen. Es handelt sich um den Mittelwert \pm Standardabweichung, mit $*=p < 0,05$, $**=p \leq 0,01$, $***=p \leq 0,001$, $****=p \leq 0,0001$ gegenüber der Kontrollgruppe.

Zytokin (pg/ml)	Kontrollgruppe	6 Stunden	24 Stunden	7 Tage	24 Stunden ohne AB
IL-4	0 ± 0	2.23 ± 2.101	1.334 ± 2.302	16.1 ± 21.27 *	1.877 ± 2.423
IL-5	0.759 ± 2.4	67.7 ± 25.18 ****	28.44 ± 13.12	72.03 ± 51.61 ***	30.96 ± 18.55
IL-10	10.64 ± 5.841	6961 ± 3220 ***	8200 ± 6716 ***	236.1 ± 282.0	5963 ± 5441 **
IL-13	70.11 ± 19.57	858.1 ± 281.7 ***	353.3 ± 256.1	299 ± 387.4	501.4 ± 390.7 *

3.3.7.3 Veränderungen der Wachstumsfaktoren und Chemokine

Viele der genannten Faktoren stimulieren die Proliferation von determinierten hämatopoetischen Stammzellen und fördern deren Differenzierung bzw. Reifung. Zugleich fördern einige von ihnen die Wanderung von Immunzellen an den Ort der Infektion, sie wirken chemotaktisch.

Wachstumsfaktoren:

G-CSF, Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor, zeigte einen signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe ($p < 0,0001$), der 24-Stunden-Gruppe ($p = 0,0035$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p = 0,0076$) gegenüber der Kontrollgruppe, während kein signifikanter Anstieg bei dem Vergleich der 7-Tage-Gruppe mit der

Kontrollgruppe zu detektieren war. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Abfall in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0064$).

M-CSF, der Makrophagen-Kolonien-stimulierende Faktor, stieg signifikant in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0071$) und der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0137$) im Vergleich zur Kontrollgruppe an. M-CSF war in der 7-Tage-Gruppe im Vergleich zur 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0006$), zur 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0012$) und zur 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0221$) signifikant erniedrigt.

Auch der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Wachstumsfaktor GM-CSF, welcher ebenfalls einen starken „priming effect“ auf Phagozyten ausübt, stieg gegenüber der Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0008$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0490$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0367$) signifikant an.

IL-3, ein von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen gebildeter multiple Kolonien-stimulierender Faktor, zeigte einen signifikanten Anstieg der 6-Stunden-Gruppe mit der Kontrollgruppe ($p=0,0007$).

Bei IL-7, ein von Stromazellen im Knochenmark und dem Thymus produziertes lymphopoetisches Zytokin mit regulatorischer Wirkung auf die B- und T-Zellproliferation, ließ sich lediglich in der 6-Stunden-Gruppe ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe detektieren ($p=0,0036$).

Interleukin-9, ein v.a. von T-Zellen produzierter Regulator zahlreicher hämatopoetischer Zellen, zeigte einen signifikanten Anstieg in der 6-Stunden-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p<0,0001$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,0094$). Außerdem ließ sich ein signifikanter Abfall in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe feststellen ($p=0,0152$).

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, welcher von sehr vielen Zellarten u.a. von T-Zellen gebildet wird, stieg lediglich in der 6-Stunden-Gruppe gegenüber zur Kontrollgruppe signifikant an ($p=0,0022$).

Chemokine:

Von den vier Arten von Chemokinen (CC, CXC, C und CX₃C) wurden Vertreter aus der Subfamilie der CC und CXC der Chemokine im Plasma gemessen. CC-Chemokine wirken vornehmlich auf Monozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie Mastzellen und Eosinophile, während CXC-Chemokine hauptsächlich neutrophile Granulozyten aber auch NK- und T-Zellen an den Ort einer Infektion anziehen. Letzteres erfolgt

insbesondere nach aktivierungs-abhängiger Expression von CXC3-Rezeptoren, an welchen durch IFN- γ induzierbare CXC-Chemokine, wie MIG (CXCL9) und IP-10 (CXCL10) binden.

MCP-1 („monocyte chemoattractant protein“) bzw. CCL2 wird von Monozyten, Makrophagen produziert und wirkt auf diese selbst chemotaktisch sowie auf T-Zellen. Es zeigte einen signifikanten Anstieg in allen Gruppen außer der 7-Tage-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (6-Stunden-Gruppe: $p=0,0002$; 24-Stunden-Gruppe: $p=0,0208$; 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose: $p=0,0133$). Außerdem sank es signifikant in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ab ($p=0,0046$).

MIP-1a („macrophage inflammatory protein“) oder CCL3 wird ebenfalls von Monozyten und Makrophagen produziert und wirkt auf zahlreiche Zellarten des Immunsystems (NK-Zellen, Monozyten, T-Zellen, usw.) chemotaktisch. Es stieg im Hinblick auf die Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0001$), in der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,002$) und in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0008$) signifikant an. Keine signifikante Änderung ergaben sich bei dem Vergleich der Kontrollgruppe mit der 7-Tage-Gruppe.

MIP-1b, ein CCL4-Chemokin, welches ebenfalls in Monozyten und Makrophagen produziert wird und wie MIP-1a auf die o.g. Zellarten des Immunsystems wirkt, verhielt sich wie MIP-1a, mit der Ausnahme, dass sich außerdem ein signifikanter Abfall des Zytokins in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe erkennen ließ ($p=0,0064$).

RANTES („regulated on activation normal T-cell expressed and secreted“) oder CCL5 wird produziert von aktivierten T-Zellen und Monozyten. Es wirkt chemotaktisch auf T-Zellen selbst sowie auf basophile und eosinophile Granulozyten. Es stieg ebenfalls in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0004$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0067$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,014$) signifikant an und fiel in der 7-Tage-Gruppe im Vergleich zur 6-Stunden-Gruppe ab ($p=0,0264$).

Bei Eotaxin oder CCL11, ein Chemokin für eosinophile Granulozyten und T-Zellen, zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich der 6-Stunden-Gruppe mit der Kontrollgruppe ($p=0,0036$) und der 6-Stunden-Gruppe mit der 7-Tage-Gruppe ($p=0,0007$).

KC („keratinocytes-derived chemokine“) oder CXCL1 zählt zu den CXC-Chemokinen und wird von Makrophagen, Neutrophilen, Epithelzellen oder Th17-Lymphozyten

produziert. Es hat eine vornehmliche Wirkung auf neutrophile Granulozyten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg es in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0031$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0437$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0288$) signifikant an und fiel in der 7-Tage-Gruppe im Vergleich zur 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0035$), zur 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0405$) und zur 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0275$) signifikant ab.

MIP-2 oder CXCL2 wird ebenfalls von Monozyten und Makrophagen produziert. Es besitzt wie alle CXC-Chemokine hauptsächlich chemotaktische und aktivierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten. MIP-2 zeigte einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0056$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0276$) sowie einen signifikanten Abfall in der 7-Tage-Gruppe im Vergleich zur 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0003$), 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0106$) und 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0019$).

Das Lipopolysaccharid-induzierte CXC-Chemokin LIX oder CXCL5, welches vor allem von Fibroblasten produziert wird, nahm gegenüber der 6-Stunden-Gruppe in der 7-Tage-Gruppe ($p=0,0016$), der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0037$) und der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose ($p=0,0019$) ab.

MIG („monokine induced by gamma interferon“) oder CXCL9 wird nach Stimulation von Monozyten, Makrophagen durch IFN- γ von diesen Zellen produziert und reguliert die Migration sowie Aktivierung von NK-Zellen, Makrophagen und T-Zellen. Es zeigte einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe in der 6-Stunden-Gruppe ($p<0,0001$) und der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose ($p=0,0302$), sowie ein Abfall in der 7-Tage-Gruppe gegenüber der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0001$).

IP-10 („interferon gamma inducible protein 10“) bzw. CXCL10 wird von Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten nach Stimulation mit IFN- γ produziert und wirkt wiederum auf Monozyten und auch auf NK- und T-Zellen chemotaktisch. Im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg es signifikant in der 6-Stunden-Gruppe ($p<0,0001$) und in der 24-Stunden-Gruppe an ($p=0,0129$). Außerdem zeigte sich ein signifikanter Abfall bei einem Vergleich der 7-Tage-Gruppe mit der 6-Stunden-Gruppe ($p=0,0006$) und der 24-Stunden-Gruppe ($p=0,0348$).

Tabelle 8: Wachstumsfaktoren und Chemokine: Es gilt n=10 für die Kontrollgruppe und n=7 für die restlichen Gruppen. Es handelt sich um den Mittelwert +/- Standardabweichung, mit *=p < 0,05, **=p ≤ 0,01, ***=p ≤ 0,001, ****=p ≤ 0,0001 gegenüber der Kontrollgruppe, #=p < 0,05, ##=p ≤ 0,01, ###=p ≤ 0,001 gegenüber der 6 Stunden-Gruppe.

Zytokin (pg/ml)	Kontrollgruppe	6 Stunden	24 Stunden	7 Tage	24 Stunden ohne AB
G-CSF	1054 ± 1518	83758 ± 30249 ****	62419 ± 21023 **	1228 ± 329.6 ##	69159 ± 2803 **
M-CSF	8.535 ± 5.424	117.8 ± 68.09 **	338.2 ± 412.4 *	3.074 ± 4.601 ###	67.31 ± 50.44
GM-CSF	9.95 ± 14.16	225 ± 67.44 ***	141.8 ± 85.84 *	130.2 ± 174.0	165.2 ± 115.8 *
IL-3	0 ± 0	10.69 ± 3.20 ***	6.584 ± 4.495	5.137 ± 7.405	6.629 ± 6.863
IL-7	10.7 ± 33.84	29.17 ± 13.58 **	12.28 ± 8.795	9.557 ± 13.20	20.25 ± 17.57
IL-9	79.27 ± 32.25	411.7 ± 115.3 ****	231.2 ± 117.9	123.3 ± 60.58#	279.4 ± 137.5 **
VEGF	0 ± 0	9.771 ± 2.840 **	11.44 ± 15.84	1.8 ± 4.762	4.487 ± 4.771
MCP-1	23.26 ± 11.90	10919 ± 7357 ***	5121 ± 6018 *	31.77 ± 14.07 ##	4896 ± 8139 *
MIP-1α	32.22 ± 31.69	950.4 ± 389.4 ***	751.4 ± 423.9 **	197.3 ± 154.7	986.1 ± 799.5 ***
MIP-1β	72.39 ± 56.81	9057 ± 7545 ***	3068 ± 4279 *	176 ± 196.6 ##	6912 ± 10094 **
RANTES	17.22 ± 9.294	550.7 ± 287.5 ***	438.7 ± 457.9 **	58.88 ± 63.99 #	362.1 ± 366.3 *
Eotaxin	655.5 ± 354.5	4956 ± 3803 **	2473 ± 2056	470.3 ± 135.0 ###	2346 ± 2332
LIX	377.9 ± 127.7	951.7 ± 485.2	991 ± 588.6	137.3 ± 134.6 ##	1235 ± 1020
KC	180.6 ± 134.6	39423 ± 17742 **	23073 ± 19296 *	154.8 ± 133.4	24875 ± 17950 *
MIP-2	39 ± 46.01	14711 ± 7502 **	6673 ± 7903	8.403 ± 13.04	12235 ± 14270 *

IP-10	165.4 ± 64,9	2751 ± 536.7 ***	1867 ± 1393 *	165.7 ± 49.92	1372 ± 1033
MIG	62.73 ± 29.24	6175 ± 2603 ****	1815 ± 1051 *	60.47 ± 23.02 ###	1473 ± 1064

3.3.8 Vergleich der Zytokine der 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

Bei Vergleich der Konzentrationen der Zytokine in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose fielen einzelne Zytokine auf, welche in der mit dem Breitspektrumantibiotikum behandelten Gruppe gegenüber den unbehandelten Tieren erhöht waren. Die in der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose gegenüber ohne Antibiose erhöhten (Mittel)werte dieser Zytokine erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Die Zytokine können in ihrer Entstehung und Wirkung einer NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse zugeordnet werden, welche die antibakterielle Immunantwort fördert. Diese Zytokine sind das IFN- γ induzierte MIG, sowie das ebenfalls IFN- γ induzierte IP-10, der u.a. von T-Zellen produzierte Faktor RANTES und das gegenregulatorische antiinflammatorische Zytokin IL-10. Diese Tendenz einer Erhöhung der Zytokine, welche einer NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse zugeordnet werden können, bei Tieren mit Antibiotikatherapie im Vergleich zu den unbehandelten Tieren steht im Gegensatz zur Tendenz einer Abnahme der meist außerhalb der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse verbleibenden anderen pro-, antiinflammatorischen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine (**Tabellen 6, 7, 8**).

3.3.9 Korrelation der Zytokine mit dem MSS in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

Unter allen 32 auf Korrelation zum MSS geprüften Zytokine zeigten sich in der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose positive Korrelationen zwischen Zytokinen der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse zum MSS, d.h. für IFN- γ ($r=0,7382$; $p=0,0291$), MIG ($r=0,9319$; $p=0,0011$), IP-10 ($r=0,6764$; $p=0,0476$) und für RANTES ($r=0,7306$; $p=0,0311$). Es bestand eine positive Korrelation für IL-10 ($r=0,7505$; $p=0,026$). Bei den Wachstumsfaktoren und Chemokinen lagen signifikante Korrelationen zum MSS für KC ($r=0,6981$; $p=0,0406$) und MIP-1a ($r=0,6942$; $p=0,0418$) vor.

In der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose zeigten sich erneut signifikante Korrelationen für die Zytokine entlang der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen Achse. Signifikante Korrelationen mit dem MSS bestanden für IP-10 ($r=0,6818$; $p=0,0458$) und RANTES ($r=0,7333$; $p=0,0304$),

Weitere signifikante Korrelationen zum MSS zeigten sich darüber hinaus und im Vergleich zu den mit Antibiotika therapierten Tiere in einer deutlich größeren Zahl der Fälle für die meisten proinflammatorischen, antiinflammatorischen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine (**Tabellen 9 bis 13**). Bei Überprüfung der Häufigkeiten, mit der sich für die 32 bestimmten Zytokine signifikante Korrelationen zum Schweregrad der Sepsis der Tiere 24 Stunden nach Sepsisinduktion ergaben, zeigte sich eine signifikant niedrigere Häufigkeit bei mit Antibiotika therapierten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren der Kontrolle (**Tabelle 14**).

Tabelle 9: Korrelationen der Zytokine der NK-Zell-Monozyten-T-Zell-Achse mit dem MSS

	IFN-γ	MIG	IP-10	RANTES
24h mit AB	r=0,7382 p=0,0291	r=0,9319 p=0,0011	r=0,6764 p=0,0476	r=0,7306 p=0,0311
24h ohne AB	ns	ns	r=0,6818 p=0,0458	r=0,7333 p=0,0304

Tabelle 10: Korrelationen von proinflammatorischen Zytokinen mit dem MSS

	IL-1a	IL-1b	IL-2	IL-12	LIF	IL-17
24h mit AB	ns	ns	ns	ns	ns	ns
24h ohne AB	r=0,6809 p=0,0461	r=0,6898 p=0,0432	r=0,7170 p=0,0349	r=0,7013 p=0,0396	r=0,7773 p=0,0198	r=0,7781 p=0,0197

Tabelle 11: Korrelationen von antiinflammatorischen Zytokinen mit dem MSS

	IL-10	IL-4	IL-13
24h mit AB	r=0,7505 p=0,026	ns	ns
24h ohne AB	r=0,6878 p=0,0438	r=0,7590 p=0,0239	r=0,7773 p=0,0198

Tabelle 12: Korrelationen von Wachstumsfaktoren mit dem MSS

	G-CSF	M-CSF	GM-CSF
24h mit AB	ns	ns	ns
24h ohne AB	r=0,7443 p=0,0275	r=0,7569 p=0,024	r=0,6754 p=0,048

Tabelle 13: Korrelationen von Chemokinen mit dem MSS

	KC	MCP1	MIP-1a	MIP-1b	Eotaxin
24h mit AB	r=0,6981 p=0,0406	ns	r=0,6942 p=0,0418	ns	ns
24h ohne AB	ns	r=0,7587 p=0,024	ns	r=0,6998 p=0,04	r=0,6978 p=0,0406

Tabelle 14: Reduktion der Häufigkeit der Korrelation zum klinischen Schweregrad der Sepsis gemessen am MSS 24 Stunden nach Sepsisinduktion in den mit Antibiotikum behandelten Tieren ($p=0,02$)

	Keine Korrelation mit MSS	Korrelation mit MSS	
24h mit AB	25 (20)	7 (12)	32
24h ohne AB	15 (20)	17 (12)	32
	40	24	64

3.3.10 Korrelationen zwischen den Zytokinen in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose mit der Bakterienlast im Blut

In der 24-Stunden-Gruppe mit Antibiose bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen der Bakterienlast im Blut und IP-10 als Vertreter der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse ($r=-0,6148$; $p=0,0293$). Ebenfalls lag eine negative Korrelation zwischen der Bakterienlast und dem proinflammatorisch wirksamen Zytokin IL-1a ($r=-0,8349$; $p=0,0393$) vor. Das antiinflammatorisch wirksame IL-4 korrelierte wiederum positiv mit der Bakterienlast im Blut ($r=0,8822$; $p=0,0238$). Der Wachstumsfaktor G-CSF zeigte eine negative Korrelation mit der Bakterienlast ($r=-0,9957$; $p=0,0002$).

In der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der Bakterienlast im Blut und den Zytokinen.

3.3.11 Temperaturmessung

Die mittels Infrarotkamera detektierte Temperatur der Mäuse zeigte einen deutlichen Abfall der Körpertemperatur innerhalb der ersten 24 Stunden. Vor den Injektionen ließ sich bei den Versuchstieren der 7-Tage-Gruppe eine Körpertemperatur von $29,93 \pm 0,85^\circ\text{C}$ feststellen, die bis zur ersten Antibiotikabehandlung 10 Stunden nach den

Injektionen auf $25,99 \pm 0,62^\circ\text{C}$ abfiel. Mit zunehmender Genesung innerhalb der 7-tägigen Beobachtungszeit stieg die Temperatur wieder an auf zuletzt $31,30 \pm 1,16^\circ\text{C}$. Auch deutlich wurde eine inverse Beziehung von der Körpertemperatur mit den erhobenen MSS-Werten über den zeitlichen Verlauf (**Abbildung 16**). Eine Steigerung des Scores und somit eine Erhöhung der Erkrankungsschwere geht mit einer Erniedrigung der Körpertemperatur einher.

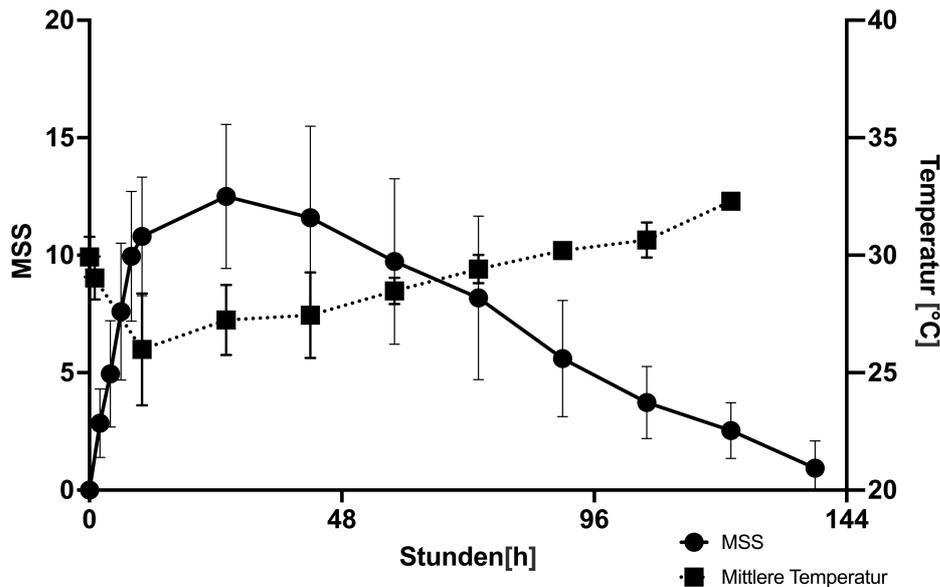


Abbildung 16: Vergleich Körpertemperatur und MSS bei n=10 zu Beginn des Versuchs

3.4 Zusammenschau klinisch relevanter Variablen in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

Alle Ergebnisse sprechen für einen Therapieerfolg durch Antibiotikagabe im direkten Vergleich zwischen der 24-Stunden-Gruppe mit und ohne Antibiose (**Tabelle 15**).

Tabelle 15: Vergleichende Zusammenschau klinisch relevanter Variablen in den 24-Stunden-Gruppen mit und ohne Antibiose

	24h ohne AB	24h mit AB	Signifikanz	Abschnitt
MSS	$15,56 \pm 3,00$	$12,00 \pm 5,03$	ns	3.3.1
Mortalität	10%	0%	$p < 0,05$	3.3.1
Leukozytenzahl im Blut	$36,7 \pm 29,9$	$4,78 \pm 4,12$	$p < 0,0001$	3.3.5

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines reproduzierbaren Modells zur Induktion einer murinen Sepsis. Das neue Modell sollte im Gegensatz zu dem bestehenden CLP-Modell eine geringere Belastung der Versuchstiere und weniger variable Faktoren aufweisen.

Die zentralen Erkenntnisse zum klinischen Verlauf des etablierten CS-Modells sind in Antwort auf unsere Fragestellung folgende:

- 1) Das CS-Modell weist eine geringere Belastung der Versuchstiere auf im Vergleich zum CLP-Modell auf, welches eine Operation erfordert.
- 2) Bei Verabreichung einer „optimalen“ Dosis CS lässt sich durch Antibiotikagabe und Flüssigkeitstherapie ein prolongierter septischer Krankheitsverlauf mit einer Mortalität von 20% induzieren.
- 3) Das etablierte CS-Modell zur Induktion einer murinen Sepsis zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit. Jede Versuchsgruppe, die gemäß standardisiertem Versuchsprotokoll (CS-Dosis, Antibiotikadosis und -Zeitintervall) behandelt wurde, verhielt sich bezüglich der Mortalitätsraten, Scores und Körpertemperatur über den zeitlichen Verlauf sehr ähnlich.
- 4) Die Behandlung der Tiere mit nur einer Dosis des Antibiotikums 10 Stunden nach intraperitonealer CS-Injektion führte weitere 14 Stunden später, d.h. 24 Stunden nach CS-Applikation nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitsschwere, sondern auch zu immunmodulatorischen Effekten (Abnahme der Zahl der zur Krankheitsschwere korrelierender Zytokine unter Erhalt der Korrelation der für die antibakterielle Abwehr bedeutsamen Zytokine der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse).

4.1 CS vs. CLP

Das CLP-Modell gilt immer noch als aktueller Goldstandard zur Induktion einer murinen Sepsis (Dejager et al., 2011; Hubbard et al., 2005). Es zeigen sich jedoch einige Vor- als auch Nachteile, wie im Folgenden ausgeführt.

4.1.1 Reproduzierbarkeit

Wie von Rittirsch et al. beschrieben müssen beim CLP-Modell vor allem verfälschende Faktoren wie die Operationsart, die Lokalisation der Ligatur am Zoekum, die postoperative Versorgung, die Größe und der Ort der Punktion sowie Unterschiede der Darmflora der Versuchstiere beachtet werden (Rittirsch et al., 2009). Kleine Unterschiede der Faktoren zwischen den einzelnen Versuchstieren können die Ergebnisse des Versuches entscheidend verändern (Rittirsch et al., 2009). Aus diesem Grund sollte das CLP-Modell immer unter standardisierten kontrollierten Bedingungen stattfinden und die Anzahl der Variablen minimiert werden, die es potenziell beeinflussen können, wie beispielsweise verschiedene Labore oder verschiedene Untersucher/Operateure (Remick et al., 2000; Stortz et al., 2017).

Das entwickelte CS-Modell weist nach Dosisfindung im Vergleich dazu eine deutlich geringere Variabilität auf. Es gelten immer dieselben Ausgangsbedingungen durch eine festgelegte Dosis des mikrobiologisch untersuchten CS. So verhält sich jede Versuchsgruppe, die mit der optimalen Dosis behandelt wurde, bezüglich der Mortalitätsraten, Scores und Körpertemperatur über den zeitlichen Verlauf sehr ähnlich. Dieses Verhalten wird durch einen Versuch von Seemann et al. 2017 bestätigt, die für ihre Versuchsreihe CS verwendeten, das aus Jena gespendet wurde (Seemann et al., 2017). Trotz veränderten Versuchsbedingungen blieb die Dosis zur Induktion der Sepsis dieselbe (Seemann et al., 2017).

4.1.2 Variabilität des Beginns und der Dauer der Sepsis sowie therapeutische Modulierbarkeit

Durch das Hervorrufen einer polymikrobiellen Infektion ähnelt sowohl das CLP-Modell als auch das CS-Modell der humanen Sepsis (Cuenca et al., 2010).

Die Schwere der Sepsis lässt sich in dem CLP-Modell durch die Lokalisation der Ligatur des Zoekums leichter variieren. Das hat jedoch auch den Nachteil, dass alle Versuchsschritte im CLP-Modell genau standardisiert werden müssen, um eine

möglichst geringe Variabilität der Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchstieren hervorzurufen (Seemann et al., 2017). In dem beschriebenen CS-Modell sollte je nach gewünschter Erkrankungsschwere und Ausfallsrate eine neue Dosisfindung erfolgen. Ein Nachteil des CS-Modells ist, dass die Versuchstiere bei einer niedrigen Dosis des CS nach 48 Stunden bereits genesen oder bei einer hohen Dosis sterben. Die Mäuse des CLP-Modells scheinen über 72 Stunden symptomatisch zu sein (Seemann et al., 2017). Erste Symptome zeigen sich im CS-Modell deutlich früher als bei dem bisher genutzten CLP-Modell, wo eher ein verspäteter Krankheitsbeginn auftritt (Remick et al., 2000; Seemann et al., 2017). Die Induktion der Sepsis ist also durch das CS-Modell deutlich schneller möglich. Mit dem CLP-Modell scheint es möglich, unter speziellen Bedingungen einen chronischen Krankheitsverlauf zu erzielen (Benjamim et al., 2004). Benjamim et al. konnten durch eine adäquate adaptierte Therapie der Sepsis ein CLP-Modell etablieren, bei dem die Versuchstiere bis zu 15 Tage septisch blieben (Benjamim et al., 2004).

Um einen prolongierten Krankheitsverlauf über 48 Stunden und eine Mortalitätsrate von 17% für die Sepsis bis 26% für die schwere Sepsis in unserem (translationalen) Sepsis-Modell erreichen zu können, wird zusätzlich zur CS-Injektion eine Behandlung mit Antibiose und Flüssigkeit benötigt. Damit lässt sich über sieben Tage eine ausreichend hohe Erkrankungsschwere erzielen, die eine deutlich geringere Variabilität aufweist als bei dem CLP-Modell (Wen, 2013).

Die Effektivität der Sepsis-Behandlung wird dadurch gezeigt, dass eine Behandlung mit Antibiotika und Flüssigkeitssubstitution zu einer Überlebensrate von 80% führt bei einer in unserem Versuch zuvor getesteten 100% tödlichen CS-Dosis. Eine derart effektive Behandlung scheint nach aktuellem Stand der Forschung bei einer ausgeprägten Form der Sepsis durch das CLP-Modell nicht möglich. Lediglich eine moderate Krankheitsausprägung scheint in diesem Modell therapierbar (Rittirsch et al., 2008).

Wie auch bei der menschlichen Sepsis sieht man sowohl in dem CLP-Modell als auch in dem CS-Modell ein deutliches Therapieansprechen auf Volumengabe und Antibiotika (Newcomb et al., 1998). Ein weiterer Vorteil des CS-Modells ist die einfachere und schnellere Induktion der Sepsis. Es ist lediglich eine kurze Anästhesie zur intraperitonealen Injektion nötig und die deutliche Belastung eines chirurgischen Eingriffs kann umgangen werden. So beeinträchtigt die Reaktion des Körpers auf die

Narkose, Operation und darauffolgende Wundheilung nicht den Versuchsablauf bzw. andere Variablen wie den MSS.

4.2 CS-Herstellung

Die Methode der Gewinnung des CS erfolgte anhand der in der Literatur beschriebenen Protokolle (Starr et al., 2014; Steele et al., 2017)..

Jede neu produzierte Charge von CS führt jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer eigenen optimalen Dosis und müsste deshalb mit einer neuen Dosisfindung hinsichtlich Mortalität und klinischem Schweregrad der Erkrankung einhergehen. Die Größe sowie der mikrobielle Inhalt des Zoekums variieren von Maus zu Maus trotz gleicher Art, Lebensbedingungen oder Alter (Starr et al., 2014). So benötigen verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche Dosen ihres CS zur Induktion einer Sepsis (Shrum et al., 2014; Starr et al., 2014). Ein Versuch sollte also idealerweise mit demselben CS durchgeführt werden, da die Herstellung eines neuen CS mit einem veränderten mikrobiologischen Spektrum einhergehen kann. Die Gruppe um Gonnert et al. beispielsweise verwendete aufbereitete humane Stuhlproben, sodass keine Versuchstiere zur Herstellung des CS euthanasiert werden mussten (Gonnert et al., 2011). Vermutlich sind auch für die Verwendung von CS humaner Herkunft ebenfalls Versuche zur Dosisfindung durchzuführen.

4.3 Adjustierung der Schwere des Krankheitsverlaufs

4.3.1 CS-Dosisfindung

Der Versuchsaufbau wurde entlang dem Versuchsprotokoll von Starr et al. bzw. Steele et al. aufgebaut (Starr et al., 2014; Steele et al., 2017). Ziel der Dosisfindung war es, ähnlich der Mortalität der Sepsis beim Menschen, eine Ausfallsrate von 17% für die Sepsis bis zu 26% für die Schwere Sepsis zu generieren (Rittirsch et al., 2009; Steele et al., 2017).

Nach dem Protokoll von Steele et al. führte eine Dosis von 250 µl CS zu einer Ausfallsrate von 100% und galt als letale Dosis, während eine Antibiotikum- und Flüssigkeits-Behandlung alle 12 Stunden eine Überlebenschance von 100% aufwies (Steele et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte nach

umfangreichen Versuchsreihen mit einer CS-Injektion von 200 µl, einer Erstgabe von 300 µl Imipenem (5mg/ml) und 400 µl NaCl 0,9% nach zehn Stunden und Wiederholung alle 16 Stunden ein reproduzierbares Modell mit einer Mortalität von 20% und einer prolongierten Erkrankungsschwere ähnlich der Sepsis beim Menschen etabliert werden. Entscheidend hierfür war die Titration der Effekte des Beginns der Antibiotikatherapie und das Dosierungsintervall sowie die Durchführung einer begleitenden Flüssigkeitstherapie.

4.3.2. Antibiotikatherapiebeginn, Dosierungsintervall und Flüssigkeitstherapie

Eine Antibiotika- und Flüssigkeitstherapie stellen einen wichtigen Bestandteil der Therapie der Sepsis beim Menschen dar und wurden in Bezug auf die Translationalität des CS-Modells als Therapiesäulen in Anlehnung an ein Protokoll von Steele et al. implementiert (Singer et al., 2016; Steele et al., 2017). Mehrere Versuchsgruppen verwendeten bereits Imipenem als Antibiotikum der Wahl bei abdomineller Sepsis (Newcomb et al., 1998; Steele et al., 2017).

Während Steele et al. allerdings 1, 6, 12 und 24 Stunden nach Sepsisinduktion mit der Therapie begannen, wurde im vorliegend beschriebenen CS-Modell die Therapie nach 10 Stunden eingeleitet, sobald die Versuchstiere ausgeprägte Symptome zeigten (Steele et al., 2017). Dies entspricht dennoch einer translationalen Herangehensweise, da zwar anhand der Leitlinien für die Therapie der Sepsis bei intensivmedizinischen Patienten eine zügige Antibiotika- und Flüssigkeitstherapie in der ersten Stunde nach Detektion und ersichtlichen klinischem Symptombeginn entscheidend ist für die Mortalität (Ferrer et al., 2014; Rhodes et al., 2017), die Detektion der Sepsis jedoch in den überwiegenden Fällen nicht gleich bei Beginn einer bakteriellen Translokation erfolgt, sondern meist aufgrund der damit einhergehenden klinischen Symptomatik erst verzögert erkannt wird. Bei vorhergehenden Zeitpunkten wie beispielsweise nach sechs Stunden wurden die Erreger so frühzeitig bekämpft, dass sich keine Sepsis entwickeln konnte.

Auch wurde die Therapie nur alle 16 Stunden wiederholt, sodass sich ein prolongierter Verlauf der Sepsis entwickeln konnte. Bei Wiederholungen alle 12 Stunden, wie es bei Steele et al. durchgeführt wurde, ließ sich hingegen kein Modell entwickeln, mit dem eine ausreichende Krankheitsschwere und eine ähnliche Mortalitätsrate wie die der menschlichen Sepsis erreicht werden konnte (Steele et al., 2017). Nach Steele et al. wurden erst nach 12 Stunden im Blut zirkulierende Bakterien nachgewiesen und ein

späterer Beginn der Antibiotikatherapie ging mit einem prolongierten Krankheitsverlauf einher, was die Ergebnisse unserer Versuche bestätigt (Steele et al., 2017).

Die Therapiedauer wurde in unseren Versuchen an den 8-stündlich erhobenen MSS angepasst. Ab einem Score < 5 wurde die supportive Therapie eingestellt. Anhand des MSS ist zu sehen, dass die Versuchstiere nicht mehr von der Behandlung profitieren. Steele et al. führte die Antibiotikagabe fünf Tage fort und die Flüssigkeitstherapie bis die Körpertemperatur der Mäuse bis mindestens 35°C gestiegen war (Steele et al., 2017). Die Beendigung der Therapie anhand des Scores birgt jedoch das Risiko nach subjektivem Empfinden des Untersuchers zu handeln.

4.4 Charakterisierung des Modells

Das entwickelte CS-Modell zur Induktion einer murinen Sepsis wurde anhand des MSS, der Mortalität, der Bakterienlast, der Leukozytenzahl im Blut, zahlreicher auf die Organfunktionen und -integrität bezogener Plasmaparameter und eines breiten Spektrums an Zytokinen sowie der Körpertemperatur charakterisiert. Die Beobachtungs- und Präparationszeitpunkte wurden aus dem Protokoll von Starr et al. übernommen und an die Verläufe des aktuellen Versuchsaufbaus adaptiert (Starr et al., 2014). Darüber hinaus wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit und ohne Antibiotikum auf o.g. Variablen 24 Stunden nach Induktion der Sepsis geprüft.

4.4.1 MSS, Mortalität und Hypothermie

Der MSS zeigte, dass Versuchstiere, die mit einer nicht letalen Dosis CS behandelt wurden, innerhalb von 144 Stunden wieder zu ihren Ausgangswerten zurückkehrten bzw. ähnliche MSS wie die Kontrollgruppe zeigten. Die Arbeitsgruppe um Seemann bestätigte diese Beobachtung, während die Versuchstiere der CLP-Gruppe bis zu 72 Stunden symptomatisch blieben (Seemann et al., 2017).

Bezüglich der Überlebensraten zeigte sich ebenfalls bei Starr et al. eine 100% Mortalität in der 200 µl-Gruppe, solange keine Behandlung mit Antibiotika oder Flüssigkeit stattfand. In der 100 µl-Gruppe überlebten auch bei Starr et al. alle Versuchstiere in derselben Altersgruppe (Starr et al., 2014).

Die beobachtete Hypothermie innerhalb der ersten 12 Stunden und die nachfolgende Normalisierung der Körpertemperatur wurde in der Literatur bereits gezeigt (Seemann et al., 2017). Tungtur et al. benutzten ebenfalls emittiertes Infrarotlicht zum Nachverfolgen und zur Temperaturbestimmung der Versuchstiere in einem Versuch

mit ALS (Amyotrophe Lateralsklerose)-Mäusen unabhängig von einer Sepsis (Tungtur et al., 2017).

4.4.2 Leukozyten

In dem beschriebenen CS-Modell zeigte sich keine signifikante Veränderung der Leukozytenkonzentration im Blut, während in verschiedenen CLP- bzw. LPS-Versuchen eine Leukopenie detektiert wurde (Remick et al., 2000). Bemerkenswert ist jedoch die Entwicklung einer ausgeprägten Leukozytose ($MW 36,73 \times 10^3 / \text{mm}^3$) 24 Stunden nach CS-Injektion in der nicht mit Antibiotika behandelten Gruppe. Um die Rolle der Leukozyten im Rahmen der murinen Sepsis differenzierter aufzuzeigen, bedarf es zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten der Durchführung eines Differentialblutbildes sowie der weitergehenden Immunphänotypisierung und funktionellen Charakterisierung zirkulierender Leukozytensubpopulationen im Blut und nach deren Auswanderung in die Gewebe.

In unserem Versuchsaufbau war ein solches Vorgehen nicht möglich, da sowohl für die Bestimmung der Bakterienlast als auch für die der Leukozyten, der Plasmaparameter und der Zytokine ausreichende Mengen an Blut benötigt wurden und auch bei finalen Blutabnahmen nur begrenzt Blutvolumen (ca. 2 ml) zur Verfügung stand. Zur Priorisierung hatten wir uns deshalb für die genannten Parameter entschieden (Mestas and Hughes, 2004).

4.4.3 Bakterienlast

Im CLP-Modell ließ sich innerhalb der ersten 24 Stunden eine Bakteriämie feststellen. Die Stärke der Bakteriämie scheint abhängig von der gewählten Intensität des Modells, also beispielsweise von der Nadeldicke (Delano et al., 2007). Auch in dem hier beschriebenen Modell konnte eine signifikante Erhöhung der Bakterienlast im Blut nach 24 Stunden ohne Antibiose im Gegensatz zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Starr et al. beschrieb eine Bakteriämie 12 Stunden nach der initialen CS-Infektion, solange noch keine Behandlung mit Antibiose und Flüssigkeit stattgefunden hatte (Steele et al., 2017). In dem hier beschriebenen CS-Modell zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Bakterienlast im Blut bereits nach 6 Stunden vor Antibiotikagabe. Ohne Antibiose stieg die Bakterienlast bis 24 Stunden nach der CS-Infektion weiter an. Während Starr et al. einen signifikanten Abfall der Bakterienlast nach drei

Behandlungen zeigte (Steele et al., 2017), konnten hier keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden. Man konnte jedoch ebenfalls einen Unterschied zwischen der 24-Stunden-Gruppe mit und ohne Antibiose deutlich erkennen. Steele et al. führte allerdings Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten an demselben Versuchstier durch, sodass keine versuchstierspezifischen Unterschiede auftreten. Sie zeigte außerdem, dass 6 Stunden nach der CS-Injektion lediglich 50% der Versuchstiere eine Bakteriämie aufwiesen (Steele et al., 2017). Auch in dem hier beschriebenen Modell zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Bakterienlast 6 Stunden nach der CS-Injektion und 24 Stunden nach Injektion.

4.4.4 Plasmaparameter

Die signifikant erniedrigten Glukosewerte wurden bereits in der Literatur bestätigt mit einem Nadir der Hypoglykämie innerhalb der ersten 12 Stunden (Seemann et al., 2017; Steele et al., 2017).

Sowohl in dem beschriebenen CS-Modell als auch bei Seemann und Starr et al. zeigte sich im Hinblick auf die Leberfunktion ein signifikanter Anstieg des Leberenzym ALT innerhalb der ersten 24 Stunden, während sich im CLP Modell auch nach den ersten 24 Stunden eine kontinuierlichere Steigerung zeigte (Seemann et al., 2017; Starr et al., 2014). Nicht nur die einzelnen Leberenzyme zeigen einen Anstieg, sondern auch der De-Ritis-Quotient zeigte sich bis in die 7-Tage-Gruppe deutlich erhöht. Dies spricht für einen prolongierten Verlauf der Sepsis und eine Affektion der Leberfunktion im Zusammenhang mit der abdominalen Sepsis.

4.4.5 Zytokine

Die vorliegende Arbeit charakterisiert erstmals ein murines Sepsis-Modell anhand eines breiten Spektrums von 32 pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie Chemokinen.

Eine weitere Neuerung ist, dass in dem beschriebenen CS-Modell ein Zeitverlauf der Zytokine über sieben Tage untersucht wurde. Ein derart langer Zeitraum wurde in bisherigen Arbeiten zum CS-Modell noch nicht beschrieben.

Einen Anstieg der proinflammatorischen Zytokine vor allem in einem kurzen Abstand zu der Induktion der Sepsis zeigte sich nicht nur im CS-Modell, sondern auch bei CLP-Versuchstieren und wurde beispielsweise für IL-6 auch mehrfach von anderen Versuchsgruppen nachgewiesen (Seemann et al., 2017; Xiao et al., 2006).

TNF- α schien im CLP-Modell im Plasma kaum anzusteigen (Remick et al., 2000). Während im beschriebenen CS-Modell die proinflammatorischen Zytokine nach 24 Stunden wieder sanken, sah man in dem CLP-Modell eine länger andauernde Erhöhung mit weniger hohem Peak (Seemann et al., 2017). Als Kompensationsmechanismus schien das antiinflammatorische IL-10 besonders innerhalb der ersten Stunden signifikant anzusteigen. An Tag 7 ließ sich der Anstieg von IL-10 nicht mehr nachweisen. Ähnlich stellte sich der Verlauf bei Seemann et al. dar. Das CLP-Modell wies auch zu späteren Zeitpunkten, beispielsweise nach 48 Stunden, hohe IL-10-Werte auf (Seemann et al., 2017). Remick et al. hatte, wie bereits beschrieben, gezeigt, dass es im CLP-Modell zu einer verzögerten Sepsis-Induktion kam (Remick et al., 2000). Ebong et al. zeichnete wiederum einen Peak für IL-10 nach 16 Stunden nach CLP auf und einen kontinuierlichen Abfall bis 24 Stunden nach Sepsis-Induktion (Ebond et al., 1999).

Neben der Klassifikation von Zytokinen in proinflammatorische, TH1-, TH17- Zytokine, antiinflammatorische Zytokine, TH2-Zytokine, sowie in Wachstumsfaktoren und Chemokine nimmt für die Abwehr von Infektionen die Interaktion von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine zentrale Bedeutung ein. An der Schnittstelle von angeborenem, nicht-adaptivem und erworbenem, adaptivem Immunsystem steht hier die Interaktion von NK-Zellen, Makrophagen (Monozyten, dendritische Zellen) und T-Zellen (**Abbildung 17**).

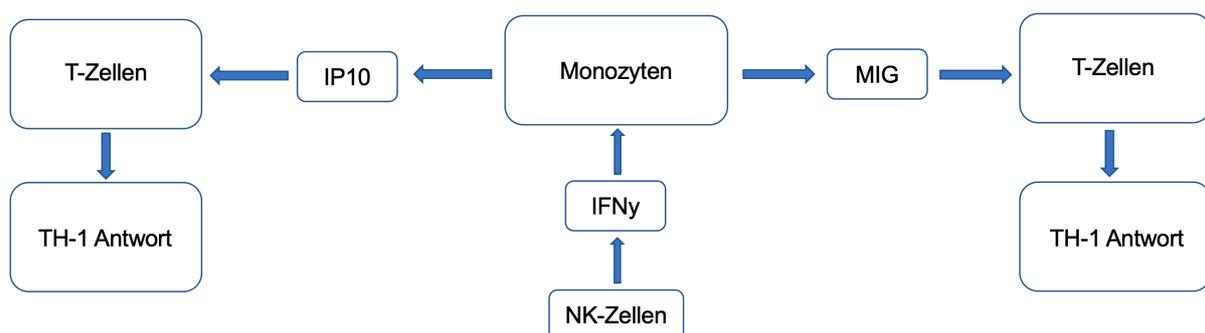


Abbildung 17: NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse

IP-10 und MIG werden von Monozyten/Makrophagen freigesetzt vor allem nach deren Stimulation mit IFN- γ aus NK-Zellen. Diese Zytokine/Monokine gehören zu einem Komplex, der zur Ausdifferenzierung der T-Zellen führt, allerdings in Richtung TH1-Zellen (Zlotnik and Yoshie, 2000). RANTES, welches von T-Zellen selbst produziert

wird, wirkt chemotaktisch und zieht weitere NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in ein bestehendes Entzündungsgebiet an, zudem bewirkt es die Aktivierung und Proliferation der NK-Zellen (Borish and Steinke, 2003). NK-Zellen wiederum gelten als Hauptverantwortliche für die Produktion und Freisetzung von IFN- γ (Etogo et al., 2008). Makrophagen und Monozyten wiederum führen dazu, dass sich T-Zellen stärker vermehren und sich je nach vorherrschendem polarisierendem Zytokinmilieu zu TH1- und TH2-Zellen ausdifferenzieren (Borish and Steinke, 2003; Gui et al., 2012). T-Zellen sind schließlich für die erworbene zelluläre Immunantwort zuständig. Hieraus lässt sich eine NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse bilden, da alle diese Zytokine über die Aktivierung der NK-Zellen über eine direkte IFN- γ abhängige Aktivierung der Monozyten/Makrophagen eine Ausdifferenzierung von T-Zellen zu TH1-Helfer-Zellen führen (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012). Diese wiederum sind ein entscheidender Baustein in der antibakteriellen Immunantwort (Hotchkiss et al., 2013). Demgegenüber und entgegen gerichtet wirkt IL-10, welches ebenfalls von Monozyten und regulatorischen T-Zellen freigesetzt wird und welches sowohl für eine Ausdifferenzierung von TH2-Zellen (Opal and DePalo, 2000) als auch für eine verminderte Freisetzung von IFN- γ (Chaudhry et al., 2013; Opal and DePalo, 2000) sorgt.

Interessant ist, dass sich in der 24-Stunden-Gruppe, welche mit Antibiotika behandelt wurde, vor allem solche Zytokine gegenüber den nicht mit einem Antibiotikum behandelten Tieren erhöht zeigten, die der NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse zugeordnet werden können (s. Tabellen 5 und 7). Dies trifft für das IFN- γ induzierte MIG sowie für das ebenfalls IFN- γ induzierte IP-10 und den u.a. von T-Zellen produzierten Faktor RANTES zu. Aber auch für das gegenregulatorische, vor Organschäden schützende, antiinflammatorische Zytokin IL-10, welches ebenfalls durch NK-Zellen, Monozyten und T-Zellen gebildet wird. Allerdings zeigte sich für diese Zytokine nur eine Tendenz, ohne statistische Signifikanz zu erreichen, was jedoch beispielsweise an den niedrigen Stichprobengrößen mit $n=7$ liegen könnte. Untermuert wird die Bedeutung der Zytokine der NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse allerdings durch ihre signifikante Korrelation mit dem MSS, d.h. mit dem Schweregrad des klinischen Krankheitsbildes selbst dann, wenn die Tiere mit Antibiotikum behandelt wurden. Dies steht im Gegensatz zur Reduktion der Zahl beobachteter Korrelationen zum MSS für die meisten pro- und

antiinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokine außerhalb der NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse bei den mit einem Antibiotikum therapierten Tieren (s. Absatz 3.3.8). Offensichtlich blieb die Korrelation der Zytokine entlang der NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen-Achse zum Schweregrad des klinischen Krankheitsbildes trotz Therapie mit einem Antibiotikum erhalten. Da in der mit einem Antibiotikum behandelten Gruppe der MSS, die Mortalität, die Leukozytenzahlen und damit insgesamt das Ausmaß der Schwere der Sepsis deutlich geringer ausgeprägt war als in der unbehandelten 24 Stunden Gruppe (s. Absatz 3.4) kann hieraus der Schluss gezogen werden, dass die Aktivierung der NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse auch bei geringerem Schweregrad einer Sepsis erhalten bleibt und für die immunologische Abwehr unter Antibiotikatherapie verbliebener Bakterien zur Verfügung steht. Gestärkt wird diese Schlussfolgerung auch durch die signifikante negative Korrelation zwischen der Bakterienlast und dem Zytokin IP-10 in der mit Antibiotikum behandelten 24-Stunden-Gruppe (s. Absatz 3.3.9). Es stellt sich damit auch die Frage, inwieweit durch die Wirkung des Antibiotikums, d.h. durch die Abtötung der Bakterien Substanzen vermehrt freigesetzt werden, welche NK-Zellen zur Produktion von IFN- γ stimulieren. Da NK-Zellen, Monozyten und T-Zellen (insbesondere regulatorische T-Zellen) ebenso IL-10 bilden, könnten analoge Überlegungen auch für die gegenregulatorische Bildung von IL-10 angeführt werden. Tatsächlich war in den mit Antibiotikum behandelten Tieren die Bildung von IL-10 tendenziell erhöht und die Korrelation zum MSS blieb erhalten.

Auch andere Untersucher unterstützen die Beobachtung eines immunmodulatorischen Effektes eingesetzter Antibiotika.

So wurden bereits für einige Antibiotika immunmodulatorische Effekte publiziert, wie zum Beispiel für Ciprofloxacin oder Makrolid-Antibiotika (Vianna et al., 2004; Ziegeler et al., 2006). Vianna et al. beschrieb erstmals einen Anstieg des antiinflammatorischen IL-10 nach 24 Stunden im CLP-Modell nach Behandlung mit Ciprofloxacin oder Imipenem. Wie oben bereits beschrieben, hat IL-10 die Fähigkeit überschießenden Entzündungsreaktionen entgegen zu wirken und so vor Organschäden zu schützen. Bei TNF- α oder IL-6 zeigten sich, wie auch in dem hier beschriebenen Versuch, niedrigere Zytokinspiegel in allen Versuchsgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Vianna et al., 2004).

Auch Ziegeler et al. konnte einen Anstieg von IL-10 durch Vancomycin nachweisen (Ziegeler et al., 2006). Gogos et al. zeigte nach Behandlung mit Ciprofloxacin wiederum erst einen Anstieg von antiinflammatorischen Zytokinen und im Verlauf ab ca. 48 Stunden einen Abfall (Gogos et al., 2004). Dies wird ebenfalls von Kahn et al. gezeigt bei IL-10 (Khan et al., 2000).

Alle diese Befunde weisen zusammen auf eine direkte chemotherapeutische und immunologische (NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen vermittelte) antibakterielle Wirksamkeit der Antibiotikatherapie hin, sowie auf eine Stärkung antiinflammatorischer Mediatoren zum Schutz vor inflammatorischen Organschäden.

4.4.6 Erfolg der Antibiose

Zusammenfassend lässt sich durch eine Antibiotikatherapie eine deutliche Reduktion der Mortalität und der klinischen Erkrankungsschwere erzielen. Dies zeigt sich nicht nur anhand tendenziell unterschiedlicher Werte des MSS und an den Unterschieden der Mortalität (**Tabelle 14**), die noch deutlicher werden, sobald man die Versuchszeit von 24 Stunden ausweitet. Die hier zum Zeitpunkt 24 Stunden nach CS-Injektion noch fehlende Signifikanz zwischen den MSS-Werten kann eventuell durch falsch niedrige Werte in der 24-Stunden-Gruppe ohne Antibiose durch eine verstorbene Maus zustande kommen. Für eine deutlich geringere Erkrankungsschwere bei den mit Antibiotika behandelten Tieren spricht auch die im Normalwertebereich verbliebene Konzentration der Leukozyten im Blut, welche bei den unbehandelten Tieren fast auf das Zehnfache ansteigt (**Abbildung 14**). Ebenso zeigt sich nur bei den nicht mit einem Antibiotikum behandelten Tieren eine signifikante Korrelation zwischen der im Blut und in der Leber vorhandenen Bakterienlast zum MSS, während bei den mit Antibiotikum behandelten Tieren eine Beziehung zum Erkrankungsschweregrad beseitigt ist (s. Absatz 3.3.2.1 und Absatz 3.3.3.1). Auch bei den Zytokinen lässt sich eine signifikante Reduktion der Zahl an Korrelationen zur klinischen Erkrankungsschwere durch eine Antibiotikatherapie nachweisen (s. Absatz 3.3.8 Tab. 13). Bemerkenswert ist jedoch die Aufrechterhaltung der Korrelation von Zytokinen der NK-Zellen-Monozyten/Makrophagen-T-Zellen-Achse zum MSS, selbst bei den mit Antibiotikum behandelten Tieren (Vgl. z.B. **Tabelle 9 mit 10**, Absatz 3.3.8).

Alle Ergebnisse sprechen also für einen Therapieerfolg durch Antibiotikagabe im direkten Vergleich zwischen der 24-Stunden-Gruppe mit und ohne Antibiose.

4.5 Vergleich mit der humanen Sepsis

In früheren Veröffentlichungen wurde bereits mehrmals diskutiert, ob murine Sepsismodelle eine menschliche Sepsis imitieren können. Es herrscht bisher eine inkonsistente Datenlage und somit eine eingeschränkte Evidenz bezüglich der Fragestellung. Seok et al. deklarierten erstmals einige wenige Korrelationen zwischen den genetischen Immunantworten, was aber bereits wieder in Frage gestellt wurde (Seok et al., 2013; Takao and Miyakawa, 2015).

Bei der Zytokinkaskade, die durch eine beginnende Sepsis induziert wird, scheint es Ähnlichkeiten zu geben.

Wie in der Literatur beschrieben, gilt IL-1 als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine beim Menschen und scheint signifikant mit einem schlechten Outcome assoziiert zu sein (Chousterman et al., 2017; Hecker et al., 2019). Auch bei unserem CS-Modell waren deutlich erhöhte IL-1-Werte in der frühen Phase der Sepsis zu sehen. Hier wäre ein weiterer interessanter Aspekt zu überprüfen, ob deutlich höhere IL-1-Werte bei Mäusen nachzuweisen sind, die im weiteren Versuchsverlauf an der Sepsis sterben. IL-6, bei dem vermutet wird, dass es eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des Komplementwegs und des „capillary leak“ spielt, schien wie auch beim Menschen signifikant erhöht in der initialen Phase der Sepsis.

IL-12 zeigte sogar bis in die 7-Tage-Gruppe einen signifikanten Anstieg, sodass man von einem prolongierten Verlauf der Sepsis ausgehen kann.

Viele Zytokine, die beispielsweise von Hecker et al. bereits in der menschlichen Sepsis beschrieben sind, lassen sich auch in diesem CS-Modell nachweisen, was als weitere Ähnlichkeit zwischen der Sepsis beim Menschen und der Sepsis der Versuchstiere in diesem CS-Modell zu werten ist (Hecker et al., 2019):

TNF- α war in allen Gruppen außer der 7-Tage-Gruppe signifikant erhöht. VEGF als Wachstumsfaktor beim Menschen ließ sich in der 6-Stunden-Gruppe erhöht nachweisen. Die Erhöhung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde ebenfalls bei der menschlichen Sepsis nachgewiesen (Chousterman et al., 2017).

Insgesamt liegt es nahe, dass ein ähnliches Verhalten der Zytokine bei Menschen und Mäusen existiert. Auch die Zeitverläufe der Zytokine bei Mäusen und Menschen scheinen sich zu ähneln, allerdings wäre ein Peak der Zytokine bereits vor dem in der beschriebenen Studie ersten gewählten Messzeitpunkt von 6 Stunden nach bereits zwei bis vier Stunden zu erwarten (Chousterman et al., 2017; Copeland et al., 2005).

Die meisten Zytokine erreichten im LPS-Modell innerhalb von 24 Stunden bereits ihren Ausgangswert, sodass die Konzentrationen der Zytokine in der 7-Tage-Gruppe bereits wieder das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe erreichten (Copeland et al., 2005). Die Versuchsgruppe um Copeland et al., die mit dem LPS-Modell arbeitete, bestätigte die Ergebnisse, dass sich bei den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 kein signifikanter Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt zeigt. Sie wiesen denselben Peak auf wie die proinflammatorischen Zytokine (Copeland et al., 2005). Der zeitliche Verlauf mit dem Peak der Zytokine innerhalb der ersten 24 Stunden auch beim Menschen wurde durch mehrere Studien bestätigt (Boujoukos et al., 1993; Calvano et al., 1994; Cannon et al., 1990).

In dem beschriebenen CS-Modell ließen sich signifikante Erhöhungen der ALT und AST als Zeichen einer Leberdysfunktion nachweisen. Dies zeigte sich auch an dem berechneten De-Ritis-Quotienten, der trotz Antibiotikagabe auch nach sieben Tagen deutlich erhöht war. Auch beim Menschen ist eine Erhöhung der Leberenzyme im Rahmen einer Sepsis beschrieben, was auf eine Affektion der Leber durch die Sepsis und ein beginnendes Multiorganversagen hindeutet (Woznica et al., 2018).

Ein wichtiger Unterschied zwischen muriner und humaner Sepsis bei der Antwort auf eine Sepsis ist die Verteilung der Leukozyten im Blut. Wie Gentile et al. beschrieben, überwiegen bei den Mäusen nicht wie beim Menschen die Neutrophilen, sondern die Lymphozyten (Gentile et al., 2014). Lymphozyten machen 75-90% aller Leukozyten im Blutbild der Maus aus, während Neutrophile einen 10-25%igen Anteil einnehmen, während das Blut des Menschen reich an Neutrophilen (50-70%) ist (Mestas and Hughes, 2004). Defensine werden im Gegensatz zu den Mäusen bei dem Menschen hauptsächlich durch neutrophile Granulozyten sezerniert. Bei Mäusen sind die Paneth-Zellen im Gastrointestinaltrakt dafür zuständig (Risso, 2000). Dass ein signifikanter Unterschied zwischen Leukozyten bei Menschen und Mäusen existiert, ist bereits bekannt. Bezüglich der Rolle der Leukozyten in der murinen Sepsis besteht jedoch noch eine eingeschränkte Datenlage.

Auch bei der Thermoregulation zeigt sich ein wichtiger Unterschied. Mäuse entwickeln in der akuten Phase der Sepsis eine deutliche Hypothermie, während bei Menschen Fieber zu den klassischeren Symptomen einer Sepsis zählt (Kozak et al., 1994).

Das in der humanen Sepsis häufig assoziierte akute Nierenversagen ist anhand von Kreatinin und Harnstoff im beschriebenen CS-Modell nicht nachzuweisen (Poston and Koyner, 2019).

In der akuten Phase der Sepsis ist beim Menschen häufig eine Hyperglykämie durch erhöhte hepatische Glukoneogenese und Insulinresistenz zu sehen. Die Versuchstiere des beschriebenen CS-Modells wiesen allerdings eine Hypoglykämie auf, sodass dieser Aspekt weiter zu überprüfen gilt (Aleman and Guerrero, 2018).

4.5.1 Vergleich mit der pädiatrischen Sepsis

Cavalcanti et al. beschrieben 2016 einen Anstieg von RANTES und IP-10 im Rahmen einer Sepsis oder Pneumonie bei Kindern im Alter von 28 Tagen bis 14 Jahren (Cavalcanti et al., 2016). Es wird jedoch keine Aussage über eine stattgefundene Antibiotikatherapie gemacht. Auch in dem beschriebenen CS-Modell mit 3 Monate alten Versuchstieren, die also ebenfalls als junge Mäuse beschrieben werden können, konnte ein Anstieg dieser Zytokine detektiert werden. Sowohl RANTES als auch IP-10 zählen zu Zytokinen der bereits beschriebenen NK-Zell-Monozyten-T-Zell-Achse. Aufgrund der bestehenden Sepsis bei Kindern in den beschriebenen Versuchsgruppen von Cavalcanti et al. ist von einer Antibiotikatherapie auszugehen, sodass auch für die pädiatrische Sepsis von einer dauerhaften Erhöhung von Chemokinen der NK-Zell-Monozyten-T-Zell-Achse trotz Antibiotikatherapie auszugehen ist (Cavalcanti et al., 2016).

4.6 Limitationen eines murinen Sepsis-Modells

Allen murinen Sepsis-Modellen liegen einige Limitationen zugrunde. Es bestehen nicht nur Unterschiede in der Immunantwort zwischen Mäusen und Menschen, sondern auch innerhalb der verschiedenen Stämme der Mäuse (Mills et al., 2000; Mouse Genome Sequencing et al., 2002; Sellers et al., 2012). Durch Unterschiede im Genom des Menschen im Vergleich zu den verschiedenen Mäusestämmen ergeben sich unterschiedliche Reaktionen auf eine Inflammation. Wichtige Parameter, die bei der Sepsis des Menschen bestimmt werden, verhalten sich bei Mäusen anders, wie beispielsweise die zirkulierenden Leukozyten (Gentile et al., 2014).

Die Versuchstiere werden außerdem in einer spezifischen erregerefreien Umgebung gehalten, sodass im Gegensatz zum Menschen ein noch naives Immunsystem vorliegt (Beura et al., 2016).

Entscheidend ist auch die unterschiedliche Population der Versuchsgruppe. Die Versuchstiere sind ausschließlich männliche, junge Versuchstiere und frei von

Vorerkrankungen, was nur einer Minderheit der Patienten mit Sepsis im Krankenhaus entspricht (Efron et al., 2015).

Auch Zeitverläufe sind schwierig zu übertragen, da 24 Stunden der Maus nicht 24 Stunden eines Menschen entsprechen (Gentile et al., 2014). So lassen sich Zeitpunkte nicht direkt übertragen, sondern lediglich als Tendenz und in Relation zueinander sehen.

Des Weiteren ist bei Mäusen die Diagnostik wie beispielsweise ein hämodynamisches Monitoring oder eine Bildgebung bzw. die Identifikation von Ko-Infektionen nicht in demselben Maß möglich, sodass verschiedene Einflussfaktoren auf die bestehende Sepsis nicht identifiziert und behandelt werden können.

Insgesamt betrachtet, stellt eine Sepsis bei Mäusen also kein vollständig übertragbares Krankheitsmodell auf den Menschen dar. Es zeigen sich jedoch wie oben beschrieben einige Ähnlichkeiten beispielsweise im Hinblick auf die Zytokinkaskade und auf durch die Sepsis bedingte Organdysfunktionen, die eine zumindest im Hinblick auf bestimmte Fragestellungen ausreichend Antwort gewährleisten können.

4.7 Limitationen unseres CS-Modells

Im Hinblick auf das beschriebene Versuchsmodell zeigen sich einige Limitationen. Die Zeitpunkte, an denen Präparationen durchgeführt wurden, wurden anhand des Scoring-Systems festgelegt, um eine klinische Herangehensweise zu simulieren. Der Präparationszeitpunkt nach 24 Stunden entsprach beispielsweise dem Zeitpunkt mit den maximalen klinischen Symptomen. Da jedoch beispielsweise bei den Zytokinen die Spitzenwerte in der Literatur bisher beschrieben bereits nach zwei bis vier Stunden erreicht werden, könnte man intermittierende Blutentnahmen diskutieren, was jedoch aufgrund der Größe der Versuchstiere, der Schwere der Erkrankung und deren Blutvolumen nur begrenzt möglich ist. Dennoch könnte man so einen zeitlichen Verlauf der Plasmawerte genauer darstellen und interpretieren. Außerdem wäre ein hämodynamisches Monitoring, im Idealfall mit Blutdruck und Herzfrequenz wünschenswert, um herauszufinden, ob sich die Versuchstiere auch im Hinblick auf die kardiovaskulären Symptome dem Menschen ähnlich verhalten. Auch der Gewichtsverlauf der Mäuse wurde in unserem Modell nicht untersucht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem hier vorgestellten „Cecal-Slurry“-Modell wurde ein reproduzierbares Modell der Sepsis entwickelt, dessen Krankheitsverlauf und Mortalitätsrate sich sehr ähnlich zur humanen Sepsis verhält.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine systemische Inflammation ausgelöst durch intraperitoneale Injektion von „Cecal Slurry“ den klinischen Gesundheitsstatus, die Organfunktion und die Zytokinantwort der Mäuse beeinflusst. Es konnten mit dem beschriebenen „Cecal-Slurry“-Modell über 30 verschiedene Zytokine und deren Verlauf während der Sepsis untersucht werden.

Sowohl die steigenden Werte des die Krankheitsschwere abbildenden „Murine Sepsis Score“ als auch der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine in einem kurzen Abstand zur „Cecal-Slurry“-Injektion belegen eine erfolgreiche Induktion einer Sepsis. Nach der initialen Dosisfindung ist die Induktion einer murinen Sepsis mit geringer Belastung der Versuchstiere und hoher Reproduzierbarkeit möglich. Anders als bei dem bisherigen Goldstandard, dem „Cecal-Ligation-and-Puncture“-Modell, benötigt es keine Operation zum Auslösen der Sepsis, sobald der „Cecal Slurry“ hergestellt wurde. Das „Cecal-Slurry“-Modell zeichnet sich unter anderem auch durch einen schnellen Beginn der Sepsis aus. Der Versuch, eine prolongierte Sepsis mit einem „second hit“ hervorzurufen, erwies sich als nicht erfolgreich, da auch so keine ausreichende Krankheitsschwere erzielt werden konnte. Erst durch die Injektion einer ausreichend hohen „Cecal-Slurry“-Dosis in Kombination mit Antibiotika und Flüssigkeit konnte ein prolongierter Krankheitsverlauf induziert werden, der sich in den dauerhaft erhöhten Werten im „Murine Sepsis Score“ widerspiegelte. Außerdem zeigte sich eine signifikante Reduktion der Korrelationen der Zytokine zur klinischen Erkrankungsschwere anhand des „Murine Sepsis Score“ durch eine Antibiotikatherapie. Korrelationen zwischen Zytokinen und dem „Murine Sepsis Score“ werden bemerkenswerterweise trotz Antibiose hauptsächlich in der NK-Zellen-Monozyten-T-Zell-Achse aufrechterhalten. Beinahe alle weiteren Korrelationen lösen sich durch die Antibiotikatherapie auf. Zudem weist die vergleichende Analyse mit und ohne Antibiotikum behandelte Tiere hinsichtlich der Beziehung der Zytokinprofile zum „Murine Sepsis Score“ 24 Stunden nach „Cecal-Slurry“-Injektion auf eine immunmodulatorische Wirkung des applizierten Breitspektrumantibiotikums Imipenem hin. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die antibakterielle Wirksamkeit der

Antibiotikatherapie sowohl direkt chemotherapeutisch als auch indirekt immunologisch (NK-Zellen-Monozyten-T-Zellen) vermittelt wird. Darüber hinaus scheint selbst bei reduziertem Schweregrad der Sepsis die Beziehung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zum „Murine Sepsis Score“ für den Schutz vor inflammatorischen Organschäden bestehen zu bleiben. Somit könnte das vorliegende Modell geeignet sein, die immer häufiger diskutierten immunmodulatorische Effekte einer Antibiotikatherapie in weiterführenden Experimenten (Substanz- und Dosis-spezifisch) zu untersuchen.

Wichtige Vorteile unseres „Cecal-Slurry“-Modells gegenüber dem „Cecal-Ligation-and-Puncture“-Modell sind zudem die schnellere Induktion der Sepsis, die geringere Variabilität des Krankheitsverlaufs sowie die geringere Belastung für die Versuchstiere.

Das „Cecal-Slurry“-Modell hat sich dabei als standardisiertes, reproduzierbares kliniknahes murines Sepsis-Modell erwiesen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aleman, L. und Guerrero, J. (2018). [Sepsis hyperglycemia in the ICU: from the mechanism to the clinic]. *Rev Med Chil* 146, 502-510. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000400502>
- Angus, D.C. und van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 2063. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1312359>
- Annane, D., Renault, A., Brun-Buisson, C., Megarbane, B., Quenot, J.P., Siami, S., Cariou, A., Forceville, X., Schwebel, C., Martin, C., *et al.* (2018). Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* 378, 809-818. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705716>
- Annane, D., Vignon, P., Renault, A., Bollaert, P.E., Charpentier, C., Martin, C., Troche, G., Ricard, J.D., Nitenberg, G., Papazian, L., *et al.* (2007). Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. *Lancet* 370, 676-684. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61344-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61344-0)
- Asfar, P., Meziani, F., Hamel, J.F., Grelon, F., Megarbane, B., Anguel, N., Mira, J.P., Dequin, P.F., Gergaud, S., Weiss, N., *et al.* (2014). High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N Engl J Med* 370, 1583-1593. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312173>
- Bakhtiar, A., Haider Kazmi, S.J., Asghar, M.S., Khurshaidi, M.N., Mazhar, S., Khan, N.A., Ahmed, N., Yasmin, F., Yaseen, R. und Hassan, M. (2021). Accuracy of Procalcitonin Levels for Diagnosis of Culture-Positive Sepsis in Critically Ill Trauma Patients: A Retrospective Analysis. *Cureus* 13, e12988. <https://doi.org/10.7759/cureus.12988>
- Barkhausen, J., Stoblen, F., Dominguez-Fernandez, E., Henseke, P. und Muller, R.D. (1999). Impact of CT in patients with sepsis of unknown origin. *Acta Radiol* 40, 552-555. <https://doi.org/10.3109/02841859909175583>
- Benjamim, C.F., Hogaboam, C.M. und Kunkel, S.L. (2004). The chronic consequences of severe sepsis. *J Leukoc Biol* 75, 408-412. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503214>
- Bernier-Jean, A., Albert, M., Shiloh, A.L., Eisen, L.A., Williamson, D. und Beaulieu, Y. (2017). The Diagnostic and Therapeutic Impact of Point-of-Care Ultrasonography in the Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med* 32, 197-203. <https://doi.org/10.1177/0885066615606682>
- Beura, L.K., Hamilton, S.E., Bi, K., Schenkel, J.M., Odumade, O.A., Casey, K.A., Thompson, E.A., Fraser, K.A., Rosato, P.C., Filali-Mouhim, A., *et al.* (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 532, 512-516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Bloos, F., Thomas-Ruddel, D., Ruddel, H., Engel, C., Schwarzkopf, D., Marshall, J.C., Harbarth, S., Simon, P., Riessen, R., Keh, D., *et al.* (2014). Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multi-center study. *Crit Care* 18, R42. <https://doi.org/10.1186/cc13755>
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M. und Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Borish, L.C. und Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111, S460-475. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Boujoukos, A.J., Martich, G.D., Supinski, E. und Suffredini, A.F. (1993). Compartmentalization of the acute cytokine response in humans after intravenous endotoxin administration. *J Appl Physiol* (1985) 74, 3027-3033. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.6.3027>

- Brown, R.M. und Semler, M.W. (2019). Fluid Management in Sepsis. *J Intensive Care Med* 34, 364-373. <https://doi.org/10.1177/0885066618784861>
- Caironi, P., Tognoni, G., Masson, S., Fumagalli, R., Pesenti, A., Romero, M., Fanizza, C., Caspani, L., Faenza, S., Grasselli, G., *et al.* (2014). Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N Engl J Med* 370, 1412-1421. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305727>
- Calvano, S.E., Thompson, W.A., Marra, M.N., Coyle, S.M., de Riesthal, H.F., Trousdale, R.K., Barie, P.S., Scott, R.W., Moldawer, L.L. und Lowry, S.F. (1994). Changes in polymorphonuclear leukocyte surface and plasma bactericidal/permeability-increasing protein and plasma lipopolysaccharide binding protein during endotoxemia or sepsis. *Arch Surg* 129, 220-226. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1994.01420260116016>
- Cannon, J.G., Tompkins, R.G., Gelfand, J.A., Michie, H.R., Stanford, G.G., van der Meer, J.W., Endres, S., Lonnemann, G., Corsetti, J., Chernow, B., *et al.* (1990). Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 161, 79-84. <https://doi.org/10.1093/infdis/161.1.79>
- Casserly, B., Phillips, G.S., Schorr, C., Dellinger, R.P., Townsend, S.R., Osborn, T.M., Reinhart, K., Selvakumar, N. und Levy, M.M. (2015). Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit Care Med* 43, 567-573. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000742>
- Cavalcanti, N.V., Torres, L.C., da Matta, M.C., Lindoso, C.D., LN, A.C., Duarte, M.C. und Correia, J.B. (2016). Chemokine Patterns in Children with Acute Bacterial Infections. *Scand J Immunol* 84, 338-343. <https://doi.org/10.1111/sji.12492>
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M.M., McGuire, F., Nagarkatti, P.S. und Nagarkatti, M. (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* 27, 669-684.
- Chousterman, B.G., Swirski, F.K. und Weber, G.F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 39, 517-528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Copeland, S., Warren, H.S., Lowry, S.F., Calvano, S.E., Remick, D., Inflammation und the Host Response to Injury, I. (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 60-67. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005>
- Cuenca, A.G., Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Moldawer, L.L. und Efron, P.A. (2010). Cecal ligation and puncture. *Curr Protoc Immunol Chapter 19*, Unit 19 13. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1913s91>
- Dandona, P., Nix, D., Wilson, M.F., Aljada, A., Love, J., Assicot, M. und Bohuon, C. (1994). Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1605-1608. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.6.7989463>
- De Waele, J., Lipman, J., Sakr, Y., Marshall, J.C., Vanhems, P., Barrera Groba, C., Leone, M., Vincent, J.L. und Investigators, E.I. (2014). Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infect Dis* 14, 420. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-420>
- Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. und Libert, C. (2011). Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 19, 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>
- Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., *et al.* (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204, 1463-1474. <https://doi.org/10.1084/jem.20062602>
- Dellinger, R.P., Carlet, J.M., Masur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J.C., Parker, M.M., *et al.* (2004). Surviving Sepsis Campaign guidelines for

management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 30, 536-555.

<https://doi.org/10.1007/s00134-004-2210-z>

Dellinger, R.P., Levy, M.M., Carlet, J.M., Bion, J., Parker, M.M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D.C., Brun-Buisson, C., Beale, R., *et al.* (2008). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36, 296-327.

<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000298158.12101.41>

Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Douglas, I.S., Jaeschke, R., *et al.* (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39, 165-228.

<https://doi.org/10.1007/s00134-012-2769-8>

Ebong, S., Call, D., Nemzek, J., Bolgos, G., Newcomb, D. und Remick, D. (1999). Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 67, 6603-6610.

Efron, P.A., Mohr, A.M., Moore, F.A. und Moldawer, L.L. (2015). The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol* 98, 945-952. <https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0315-127R>

Etogo, A.O., Nunez, J., Lin, C.Y., Toliver-Kinsky, T.E. und Sherwood, E.R. (2008). NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J Immunol* 180, 6334-6345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6334>

Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., *et al.* (2021a). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 49, e1063-e1143.

<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005337>

Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., *et al.* (2021b). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 47, 1181-1247.

<https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>

Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T.M., Townsend, S., Dellinger, R.P., Artigas, A., Schorr, C. und Levy, M.M. (2014). Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med* 42, 1749-1755. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000330>

Finfer, S., Bellomo, R., Boyce, N., French, J., Myburgh, J., Norton, R. und Investigators, S.S. (2004). A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med* 350, 2247-2256. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040232>

Fink, M.P. und Heard, S.O. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49, 186-196. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(90\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90260-9)

Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U. und Reinhart, K. (2016). Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 113, 159-166. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0159>

Gentile, L.F., Nacionales, D.C., Lopez, M.C., Vanzant, E., Cuenca, A., Cuenca, A.G., Ungaro, R., Baslanti, T.O., McKinley, B.A., Bihorac, A., *et al.* (2014). A better understanding of why murine models of trauma do not recapitulate the human syndrome. *Crit Care Med* 42, 1406-1413.

<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000222>

Gogos, C.A., Skoutelis, A., Lekkou, A., Drosou, E., Starakis, I., Marangos, M.N. und Bassaris, H.P. (2004). Comparative effects of ciprofloxacin and ceftazidime on cytokine production in patients with severe sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2793-2798.

<https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2793-2798.2004>

Gonnert, F.A., Recknagel, P., Seidel, M., Jbeily, N., Dahlke, K., Bockmeyer, C.L., Winning, J., Losche, W., Claus, R.A. und Bauer, M. (2011). Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res* 170, e123-134. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.019>

Gordon, A.C., Perkins, G.D., Singer, M., McAuley, D.F., Orme, R.M., Santhakumaran, S., Mason, A.J., Cross, M., Al-Beidh, F., Best-Lane, J., *et al.* (2016). Levosimendan for the Prevention of Acute Organ Dysfunction in Sepsis. *N Engl J Med* 375, 1638-1648. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609409>

Gotts, J.E. und Matthay, M.A. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353, i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>

Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T. und Muragaki, Y. (2012). Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* 2012, 693083. <https://doi.org/10.1155/2012/693083>

Hecker, A., Reichert, M., Reuss, C.J., Schmoch, T., Riedel, J.G., Schneck, E., Padberg, W., Weigand, M.A. und Hecker, M. (2019). Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. *Langenbecks Arch Surg* 404, 257-271. <https://doi.org/10.1007/s00423-019-01752-7>

Hjortrup, P.B., Haase, N., Bundgaard, H., Thomsen, S.L., Winding, R., Pettila, V., Aaen, A., Lodahl, D., Berthelsen, R.E., Christensen, H., *et al.* (2016). Restricting volumes of resuscitation fluid in adults with septic shock after initial management: the CLASSIC randomised, parallel-group, multicentre feasibility trial. *Intensive Care Med* 42, 1695-1705. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4500-7>

Hotchkiss, R.S., Monneret, G. und Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13, 862-874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>

Hu, L., Shi, Q., Shi, M., Liu, R. und Wang, C. (2017). Diagnostic Value of PCT and CRP for Detecting Serious Bacterial Infections in Patients With Fever of Unknown Origin: A Systematic Review and Meta-analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25, e61-e69. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000552>

Hubbard, W.J., Choudhry, M., Schwacha, M.G., Kerby, J.D., Rue, L.W., 3rd, Bland, K.I. und Chaudry, I.H. (2005). Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 *Suppl* 1, 52-57. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e>

Jekarl, D.W., Lee, S.Y., Lee, J., Park, Y.J., Kim, Y., Park, J.H., Wee, J.H. und Choi, S.P. (2013). Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75, 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.011>

Khan, A.A., Slifer, T.R., Araujo, F.G., Suzuki, Y. und Remington, J.S. (2000). Protection against lipopolysaccharide-induced death by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3169-3173. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.3169-3173.2000>

Kozak, W., Conn, C.A. und Kluger, M.J. (1994). Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol* 266, R125-135. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.1.R125>

Kress, J.P. und Hall, J.B. (2014). ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. *N Engl J Med* 371, 287-288. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1406274>

Kütting, D.M., R; Luetkens, Julian; Faron, Anton; Thomas, Darlene (2020). Stellenwert der Computertomografie zur Fokussuche bei Intensivpatienten mit SIRS/Sepsis und unklarem Fokus. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1703398>

Lamontagne, F., Meade, M.O., Hebert, P.C., Asfar, P., Lauzier, F., Seely, A.J.E., Day, A.G., Mehta, S., Muscedere, J., Bagshaw, S.M., *et al.* (2016). Higher versus lower blood pressure targets for vasopressor therapy in shock: a multicentre pilot randomized controlled trial. *Intensive Care Med* 42, 542-550. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4237-3>

- Leisman, D.E., Goldman, C., Doerfler, M.E., Masick, K.D., Dries, S., Hamilton, E., Narasimhan, M., Zaidi, G., D'Amore, J.A. und D'Angelo, J.K. (2017). Patterns and Outcomes Associated With Timeliness of Initial Crystalloid Resuscitation in a Prospective Sepsis and Septic Shock Cohort. *Crit Care Med* 45, 1596-1606. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002574>
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G., *et al.* (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29, 530-538. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x>
- Levy, M.M., Rhodes, A., Phillips, G.S., Townsend, S.R., Schorr, C.A., Beale, R., Osborn, T., Lemeshow, S., Chiche, J.D., Artigas, A., *et al.* (2015). Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med* 43, 3-12. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000723>
- Malbrain, M.L., Marik, P.E., Witters, I., Cordemans, C., Kirkpatrick, A.W., Roberts, D.J. und Van Regenmortel, N. (2014). Fluid overload, de-resuscitation, and outcomes in critically ill or injured patients: a systematic review with suggestions for clinical practice. *Anaesthesiol Intensive Ther* 46, 361-380. <https://doi.org/10.5603/AIT.2014.0060>
- Marx, G., Schindler, A.W., Mosch, C., Albers, J., Bauer, M., Gnass, I., Hobohm, C., Janssens, U., Kluge, S., Kranke, P., *et al.* (2016). Intravascular volume therapy in adults: Guidelines from the Association of the Scientific Medical Societies in Germany. *Eur J Anaesthesiol* 33, 488-521. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000447>
- Mestas, J. und Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J. und Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Minasyan, H. (2017). Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *J Crit Care* 40, 229-242. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.04.015>
- Monnet, X., Marik, P. und Teboul, J.L. (2016). Passive leg raising for predicting fluid responsiveness: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 42, 1935-1947. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-4134-1>
- Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Newcomb, D., Bolgos, G., Green, L. und Remick, D.G. (1998). Antibiotic treatment influences outcome in murine sepsis: mediators of increased morbidity. *Shock* 10, 110-117. <https://doi.org/10.1097/00024382-199808000-00005>
- Opal, S.M. und DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162-1172. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
- Oto, A., Schmid-Tannwald, C., Agrawal, G., Kayhan, A., Lakadamyali, H., Orrin, S., Sethi, I., Sammet, S. und Fan, X. (2011). Diffusion-weighted MR imaging of abdominopelvic abscesses. *Emerg Radiol* 18, 515-524. <https://doi.org/10.1007/s10140-011-0976-1>
- Phua, J., Ngerng, W., See, K., Tay, C., Kiong, T., Lim, H., Chew, M., Yip, H., Tan, A., Khalizah, H., *et al.* (2013). Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit Care* 17, R202. <https://doi.org/10.1186/cc12896>
- Poston, J.T. und Koyner, J.L. (2019). Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ* 364, k4891. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4891>

- Povoa, P., Coelho, L., Almeida, E., Fernandes, A., Mealha, R., Moreira, P. und Sabino, H. (2005). C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 11, 101-108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01044.x>
- Prescott, H.C. und Angus, D.C. (2018). Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA* 319, 62-75. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17687>
- Rabuel, C. und Mebazaa, A. (2006). Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med* 32, 799-807. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0142-5>
- Remick, D.G., Newcomb, D.E., Bolgos, G.L. und Call, D.R. (2000). Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 13, 110-116. <https://doi.org/10.1097/00024382-200013020-00004>
- Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Nunnally, M.E., *et al.* (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 43, 304-377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
- Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68, 785-792.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., Nadeau, B.A., Day, D.E., Huber-Lang, M., Mackay, C.R., Zetoune, F.S., Gerard, N.P., Cianflone, K., Kohl, J., *et al.* (2008). Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14, 551-557. <https://doi.org/10.1038/nm1753>
- Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A. und Ward, P.A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4, 31-36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>
- Roberts, J.A., Abdul-Aziz, M.H., Lipman, J., Mouton, J.W., Vinks, A.A., Felton, T.W., Hope, W.W., Farkas, A., Neely, M.N., Schentag, J.J., *et al.* (2014). Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. *Lancet Infect Dis* 14, 498-509. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70036-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70036-2)
- Schmit, X. und Vincent, J.L. (2008). The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection* 36, 213-219. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-7077-9>
- Schuetz, P., Birkhahn, R., Sherwin, R., Jones, A.E., Singer, A., Kline, J.A., Runyon, M.S., Self, W.H., Courtney, D.M., Nowak, R.M., *et al.* (2017). Serial Procalcitonin Predicts Mortality in Severe Sepsis Patients: Results From the Multicenter Procalcitonin MOonitoring SEpsis (MOSES) Study. *Crit Care Med* 45, 781-789. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002321>
- Seemann, S., Zohles, F. und Lupp, A. (2017). Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci* 24, 60. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8>
- Self, W.H., Semler, M.W., Wanderer, J.P., Wang, L., Byrne, D.W., Collins, S.P., Slovis, C.M., Lindsell, C.J., Ehrenfeld, J.M., Siew, E.D., *et al.* (2018). Balanced Crystalloids versus Saline in Noncritically Ill Adults. *N Engl J Med* 378, 819-828. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1711586>
- Sellers, R.S., Clifford, C.B., Treuting, P.M. und Brayton, C. (2012). Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol* 49, 32-43. <https://doi.org/10.1177/0300985811429314>
- Semler, M.W., Self, W.H. und Rice, T.W. (2018). Balanced Crystalloids versus Saline in Critically Ill Adults. *N Engl J Med* 378, 1951. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1804294>
- Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., *et al.* (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3507-3512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110>

- SepNet Critical Care Trials, G. (2016). Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med* 42, 1980-1989. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4504-3>
- Shrum, B., Anantha, R.V., Xu, S.X., Donnelly, M., Haeryfar, S.M., McCormick, J.K. und Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes* 7, 233. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Cooper-Smith, C.M., *et al.* (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801-810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Southeast Asia Infectious Disease Clinical Research, N. (2017). Causes and outcomes of sepsis in southeast Asia: a multinational multicentre cross-sectional study. *Lancet Glob Health* 5, e157-e167. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30007-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30007-4)
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Adib-Conquy, M. und Cavallion, J.M. (2012). Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med* 18, 270-285. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00201>
- Spencer, K.T., Kimura, B.J., Korcarz, C.E., Pellikka, P.A., Rahko, P.S. und Siegel, R.J. (2013). Focused cardiac ultrasound: recommendations from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 26, 567-581. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2013.04.001>
- Starr, M.E., Steele, A.M., Saito, M., Hacker, B.J., Evers, B.M. und Saito, H. (2014). A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. *PLoS One* 9, e115705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115705>
- Steele, A.M., Starr, M.E. und Saito, H. (2017). Late Therapeutic Intervention with Antibiotics and Fluid Resuscitation Allows for a Prolonged Disease Course with High Survival in a Severe Murine Model of Sepsis. *Shock* 47, 726-734. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000799>
- Stortz, J.A., Raymond, S.L., Mira, J.C., Moldawer, L.L., Mohr, A.M. und Efron, P.A. (2017). Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR J* 58, 90-105. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx007>
- Takao, K. und Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1167-1172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401965111>
- Tellor, B., Skrupky, L.P., Symons, W., High, E., Micek, S.T. und Mazuski, J.E. (2015). Inadequate Source Control and Inappropriate Antibiotics are Key Determinants of Mortality in Patients with Intra-Abdominal Sepsis and Associated Bacteremia. *Surg Infect (Larchmt)* 16, 785-793. <https://doi.org/10.1089/sur.2014.166>
- Tungtur, S.K., Nishimune, N., Radel, J. und Nishimune, H. (2017). Mouse Behavior Tracker: An economical method for tracking behavior in home cages. *Biotechniques* 63, 215-220. <https://doi.org/10.2144/000114607>
- Venkatesh, B., Finfer, S., Cohen, J., Rajbhandari, D., Arabi, Y., Bellomo, R., Billot, L., Correa, M., Glass, P., Harward, M., *et al.* (2018). Adjunctive Glucocorticoid Therapy in Patients with Septic Shock. *N Engl J Med* 378, 797-808. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705835>
- Vianna, R.C., Gomes, R.N., Bozza, F.A., Amancio, R.T., Bozza, P.T., David, C.M. und Castro-Faria-Neto, H.C. (2004). Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. *Shock* 21, 115-120. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000111828.07309.21>
- Vincent, J.L. und De Backer, D. (2016). Saline versus balanced solutions: are clinical trials comparing two crystalloid solutions really needed? *Crit Care* 20, 250. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1435-x>

Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M. und Thijs, L.G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22, 707-710. <https://doi.org/10.1007/bf01709751>

Vincent, J.L., Opal, S.M., Marshall, J.C. und Tracey, K.J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381, 774-775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61815-7)

Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., *et al.* (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302, 2323-2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>

Wen, H. (2013). Sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Methods Mol Biol* 1031, 117-124. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-481-4_15

Woznica, E.A., Ingot, M., Woznica, R.K. und Lysenko, L. (2018). Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med* 27, 547-551. <https://doi.org/10.17219/acem/68363>

Xiao, H., Siddiqui, J. und Remick, D.G. (2006). Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun* 74, 5227-5235. <https://doi.org/10.1128/IAI.01220-05>

Zahar, J.R., Timsit, J.F., Garrouste-Orgeas, M., Francois, A., Vesin, A., Descorps-Declere, A., Dubois, Y., Souweine, B., Haouache, H., Goldgran-Toledano, D., *et al.* (2011). Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality. *Crit Care Med* 39, 1886-1895. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821b827c>

Ziegeler, S., Raddatz, A., Hoff, G., Buchinger, H., Bauer, I., Stockhausen, A., Sasse, H., Sandmann, I., Horsch, S. und Rensing, H. (2006). Antibiotics modulate the stimulated cytokine response to endotoxin in a human ex vivo, in vitro model. *Acta Anaesthesiol Scand* 50, 1103-1110. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.01112.x>

Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80165-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80165-x)

7 TABELLARISCHER ANHANG

7.1 Chemikalien

30% Glycerol	Kraft, 07091.300
PBS-Puffer	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Sterile isotone NaCl-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi GmbH, Deutschland
Isofluran	CP Pharma, Bruggdorf, Deutschland
Formalin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Buprenorphin	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Liquid Nitrogen	Airliquide, Düsseldorf, Deutschland
HBSS	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Saponin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Luminex® Sheath Fluid	MERCK, Canada

7.2 Geräte und Zubehör

7.2.1 Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen 1ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalkanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Handschuhe	Braun, Melsungen, Deutschland
Reaktionsgefäße „Eppendorfcups“ 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Schraubgefäße „Falcon Tubes“ 50 ml	Corning incorporated, USA
Zellsieb Falcon® 70 µm, steril einzeln verpackt	Corning incorporated, USA
Pipettenspitzen 200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryotubes	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Einmalkapillaren	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Deutschland
Drigalskispatel, PS, steril einzeln verpackt	LLG, Meckenheim
Countess-Plättchen	ThermoFisher Scientific, Deutschland
EDTA Röhrchen	Sarstedt
LiHep-Röhrchen	Sarstedt
Mouse Cytokine/Chemokine Panel 1	MERCK, Canada
Sterile Siebe, 860 µm, 190 µm	Bellco Glass, Inc. Vineland, NJ

7.2.2 Geräte

Homogenizer pan	Bellco Glass, 1985-85000
Drahtsieb 860 µm	Bellco Glass, 1985-00020
Drahtsieb 190 µm	Bellco Glass, 1985-00080
Drahtsieb 70 µm	Bellco Glass, 1985-00200
Eismaschine	Saro, Emmerich, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät	IKA, Staufen, Deutschland
Tierwaage	Kern, Deutschland
Gewebewaage	Kern, Deutschland
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Infrarotkamera	Flir A655sc, Teledyne FLIR LLC
Kühlschränke (-20°C, -80°C)	Scala Scientific, Ludwigshafen, Deutschland
Tierhäuser, PhenoTyper IR translucent shelter	Noldus Information Technology bv, Niederlande
Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D®, MAGPIX® with	

xPONENT® software by Luminex® Corporation

Titer Plate Shaker

Countess II Automated Cell Counter

Columbia blood agar plates

MERCK, Canada

IKA, Staufen, Deutschland

ThermoFisher Scientific

Nutriplate GmbH, Deutschland

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Laura Schäfer
Geburtsdatum: 02.10.1993
Geburtsort: Kandel
Familienstand: ledig
Vater: Joachim Schäfer
Mutter: Mechthild Schäfer

SCHULISCHER WERDEGANG

2000 – 2004 Ludwig-Riedinger-Grundschule Kandel
2004 – 2013 Europa-Gymnasium Wörth
03/2013 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Oktober 2013 –
November 2019 Studium der Humanmedizin, Medizinische Fakultät
Mannheim, Universität Heidelberg

September 2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
Oktober 2018 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
Dezember 2019 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Charalambos Tsagogiorgas für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Betreuung und Geduld während der Versuche.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Manfred Thiel für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit und die Unterstützung und Betreuung gerade in den Endzügen der Dissertation.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Jörg Krebs für die Hilfe bei der Statistik.

Mein Dank gilt zudem dem gesamten Team des Tierhauses der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Mannheims für die Hilfe während den Versuchen.

Zuletzt möchte ich mich bei jenen bedanken, die mir in den letzten Jahren stets zur Seite standen und mich immer unterstützten. Vielen Dank hierfür und für unentwegte Unterstützung und Nachsicht geht an meine Eltern Mechthild und Joachim Schäfer, sowie an meine Schwester Julia Schäfer.

Außerdem danke ich Christoph Bösing für die Durchsicht der Arbeit, sowie Geduld und Verständnis.