

**Intraperitoneal-stool-injection (IPSI):
Etablierung eines Modells zur minimalinvasiven
Sepsisinduktion in der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Nina Cramer

aus Siegburg

2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Sven Klaschik
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Schlee

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.05.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Für meine Eltern Doris und Bernd Cramer

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	8
2. Einleitung	9
2.1 Definition der Sepsis und des septischen Schocks	9
2.2 Epidemiologie der Sepsis.....	9
2.3 Diagnostik	11
2.4 Therapie.....	13
2.5 Experimentelle Sepsismodelle	15
2.5.1 LPS-Modell.....	15
2.5.2 CLP-Modell	16
2.5.3 CASP-Modell.....	16
2.5.4 IPSI-Modell.....	17
2.6 Ziel der Arbeit.....	17
3. Methoden und Material	18
3.1 Sterilität	18
3.2 Versuchstiere	18
3.2.1 Haltung.....	19
3.2.2 Stuhldonoren und Stuhlrezipienten	19
3.2.3 Analgesie	19
3.2.4 Atlanto-okzipitale Dislokation unter Anästhesie mit Isofluran	20
3.3 Entnahme von Stuhl und Peritoneallavage	20
3.3.1 Eröffnung des Abdomens.....	20
3.3.2 Stuhlentnahme aus dem Caecum	20
3.3.3 Peritoneallavage	21
3.4 Mikrobiologische Untersuchungen	22
3.4.1 Drei-Ösen-Ausstrich.....	22
3.4.2 Bebrütung der beimpften Agarplatten	22
3.4.3 CHROMagar™ MH Orientation (Mast diagnostica).....	23
3.4.4 Semiquantitative Auswertung der bebrüteten CHROMagar™-Platten	24
3.4.5 Auswertung der bebrüteten CHROMagar™-Platten mit der MALDI-TOF-MS.....	26
3.5 Präparation des Stuhls zur Injektion.....	28

3.5.1 Stuhllagerung	28
3.5.2 Herstellung von Filtern zur Stuhlfiltration	28
3.5.3 Stuhlverdünnung und -filtration	29
3.5.4 Stuhlinjektion, Kontroll- und Sham-Gruppe	29
3.6 Beurteilung des Krankheitsverlaufs nach IPSI	30
3.6.1 Erhebung des Krankheitsscores	30
3.6.2 Temperaturmessung	31
3.6.3 Wiegen	31
3.6.4 Abbruchkriterien	32
3.7 Statistische Auswertung	32
3.8 Material	33
4. Ergebnisse	35
4.1 Untersuchungen des zur IPSI verwendeten Stuhls	35
4.1.1 Ausstriche der verschiedenen Stuhlverdünnungen	36
4.2 Stuhllagerung	36
4.2.1 Lagerung bei -20 °C	36
4.2.2 Lagerung bei 4 - 6 °C	37
4.3 Einfluss der Stuhlbearbeitung auf die Bakterienquantität und -qualität	38
4.4 Peritoneallavage	39
4.5 Einfluss der zirkadianen Rhythmik der Mäuse auf Gewicht und Temperatur	40
4.5.1 Gewichtsveränderung	41
4.5.2 Temperaturveränderung	42
4.6 Modulierung des Krankheitsverlaufs durch IPSI mit verschiedenen Stuhlverdünnungen	43
4.6.1 Gewichtsveränderung	44
4.6.2 Temperaturveränderung	45
4.6.3 Krankheitsscore	46
4.7 Überlebenskinetik und Krankheitsscore im längeren Krankheitsverlauf	47
5. Diskussion	50
5.1 Das optimale Tiermodell	50
5.1.1 Klinik	50
5.1.2 Induktion	51

5.1.3	Modulierbarkeit.....	52
5.1.4	Reproduzierbarkeit.....	52
5.2	IPSI als Sepsismodell	53
5.2.1	Klinik	53
5.2.2	Induktion.....	54
5.2.3	Modulierbarkeit.....	54
5.2.4	Reproduzierbarkeit.....	55
5.3	Methodik	56
5.3.1	Stuhllagerung.....	56
5.3.2	Stuhlbearbeitung.....	57
5.3.3	Klinische Parameter: Gewicht und Temperatur.....	59
5.3.4	Krankheitsscore	61
5.4	Vergleich der Modelle	62
5.4.1	IPSI versus LPS	62
5.4.2	IPSI versus CLP und CASP	64
5.5	Kritik.....	68
6.	Zusammenfassung	71
7.	Abbildungsverzeichnis.....	73
8.	Tabellenverzeichnis	74
9.	Literaturverzeichnis	75
10.	Danksagung.....	84

1. Abkürzungsverzeichnis

21 G	21 Gauge
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
CLP	Cecal ligation and puncture
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CFU	Colony forming unit
CRP	C-reaktives Protein
E. coli	Escherichia coli
GCS	Glasgow Coma Scale
HET	Haus für Experimentelle Therapie
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
IL-6	Interleukin 6
i.p.	Intraperitoneal
IPSI	Intraperitoneal Stool Injection
i.v.	Intravenös
KEESC	Klebsiella, Enterobacter, Enterococcus, Serratia und Citrobacter
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MAD	Mittlerer arterieller Druck
SOFA-Score	Sequential Organ Failure Assessment Score
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. saprophyticus	Staphylococcus saprophyticus

2. Einleitung

2.1 Definition der Sepsis und des septischen Schocks

Die Sepsis ist definiert als „*eine lebensgefährdende Organdysfunktion verursacht durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion*“. Dies ist die, im Jahr 2016 durch Singer et al. (2016) aktualisierte, Definition der Sepsis (Sepsis-3). Im Unterschied zu einer einfachen Infektion kommt es aufgrund einer inadäquaten Wirtsantwort zu einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion bis hin zum Organversagen. Inadäquate Wirtsantwort bedeutet in diesem Kontext eine fehlregulierte Immunreaktion, die sowohl durch eine Hyperinflammation als auch durch eine Immunparalyse gekennzeichnet ist (Angus und van der Poll 2013; Wiersinga et al. 2014). Entscheidend ist, dass Ausprägung, Verlauf und Ausgang der Sepsis sowohl durch Faktoren des Pathogens als auch des Patienten beeinflusst werden. Beim Patienten sind dies zum Beispiel Geschlecht, genetische Komponenten, Alter, Vorerkrankungen, Medikation und Umwelteinflüsse. Die Manifestierung kann sehr unterschiedlich sein und somit die Diagnostik der Sepsis erschweren (Singer et al. 2016).

Der septische Schock wurde ebenfalls neu definiert als „*eine Untergruppe der Sepsis, bei der die Kreislaufreaktion und die zellulären und metabolischen Veränderungen so tiefgreifend sind, dass das Sterberisiko deutlich erhöht ist*“ (Singer et al. 2016). Klinisch bedeutet dies, eine Sepsis mit persistierender Hypotension und Katecholaminbedarf, um einen MAD > 65 mmHg zu erreichen, sowie ein Serumlaktat > 2 mmol/L trotz adäquater Volumentherapie. In dieser Konstellation beträgt die Krankenhausmortalität 40 % (Singer et al. 2016).

2.2 Epidemiologie der Sepsis

Im Jahr 2013 gab es in Deutschland 279.530 an Sepsis erkrankte Patienten und 67.849 durch Sepsis verursachte Todesfälle. Das entspricht einer Krankenhausletalität von 24,3 % und 335 Sepsisfällen pro 100.000 Einwohner. Die Krankenhausletalität bei einem septischen Schock betrug 2013 58,8 % (Fleischmann et al. 2016).

In Untersuchungen des National Center for Health Statistics fanden sich 2008 in den USA 377 Sepsisfälle pro 100.000 Einwohner (Hall et al. 2011). Walkey et al. (2015) ermittelten für 2009 sogar eine Inzidenz von 535 pro 100.000 Einwohner in den USA.

Untersuchungen von Brunkhorst (2006) zufolge war die Sepsis 2006 die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. In den USA wurden mehr Patienten mit Sepsis in die Notaufnahme eingeliefert als Patienten mit Schlaganfall oder Myokardinfarkt (Seymour et al. 2012). Besonders häufig betroffen sind Neugeborene und Patienten über 85 Jahre. Die sepsisbedingte Krankenhausletalität nimmt ab dem 40. Lebensjahr zu. Männer erkranken 1,8 Mal häufiger als Frauen (Fleischmann et al. 2016).

Die Inzidenz der Sepsis steigt (Hall et al. 2011; Lagu et al. 2012; Walkey et al. 2015). 2007 lag sie in Deutschland bei 200.535 Fällen und stieg somit bis 2013 um durchschnittlich 5,7 % pro Jahr (Fleischmann et al. 2016). Die häufigere Erfassung von Sepsisfällen leistet sicherlich ihren Beitrag zu der steigenden Inzidenz (Lagu et al. 2012). Zusätzlich spielen auch Änderungen in der Klassifizierung und Diagnostik sowie mehr Bewusstsein für das Krankheitsbild eine wichtige Rolle. Auch der demografische Wandel, mit mehr älteren und polymorbiden Patienten, sowie der Fortschritt in diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen erklären die Zunahme an Sepsisfällen (Fleischmann et al. 2016; Rhee et al. 2014). So ist auch in den nächsten Jahren ein weiterer Anstieg der Inzidenz zu erwarten.

Im Vergleich von 2007 zu 2013 sank in Deutschland die Sterblichkeitsrate der Sepsis um 2,7 % und die der schweren Sepsis um 5,9 % (Fleischmann et al. 2016). Auch in den USA ist die Sterblichkeitsrate rückläufig (Lagu et al. 2012; Stevenson et al. 2014).

Laut Fleischmann et al. (2016) entstanden in Deutschland 2013 pro Sepsisfall Kosten von 27.467,92 €. 30 % des Budgets der Intensivmedizin fallen für die Behandlung der Sepsis an (Brunkhorst 2006).

Die Fallzahlen verschiedener, insbesondere internationaler, Studien sind nicht direkt miteinander vergleichbar (Fleischmann et al. 2016), da sie nicht einheitlich erhoben wurden und sich inzwischen auch die Definition der Sepsis, wie oben erläutert, verändert hat. Dennoch wird deutlich, dass es sich bei der Sepsis um ein weltweit häufiges und sehr ernstzunehmendes Krankheitsbild handelt.

In der aktuellen Leitlinie der Surviving Sepsis Campaign erklären Rhodes et al. (2017): „Sepsis and septic shock are major healthcare problems, affecting millions of people around the world each year, and killing as many as one in four (and often more)“.

2.3 Diagnostik

Zur Identifizierung der Organdysfunktion empfehlen Singer et al. (2016) den SOFA-Score (*Sequential Organ Failure Assessment Score*). Dieser wurde ursprünglich von Vincent et al. (1996) etabliert und nun von Singer et al. (2016) aktualisiert. Anhand von Messwerten, die die verschiedenen Organsysteme repräsentieren, werden bei diesem Score bis zu vier Punkte pro Organsystem vergeben (siehe Tab. 1). Bei Patienten ohne Organdysfunktion liegt der SOFA-Score bei 0. Bei einer Veränderung des Scores um 2 Punkte im Rahmen der vorliegenden Infektion ist eine Sepsis zu unterstellen.

Tab. 1: SOFA-Score: Tabelle in Anlehnung an Vincent et al. (1996)

Organ	Parameter	SOFA-Score				
		0	1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200 mit Beatmung	< 100 mit Beatmung
Gerinnung	Thrombozyten x 10 ³ /μl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber	Bilirubin mg/dl	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12,0
Herz/Kreislauf	MAD, Katecholamine [μg/kg/Min.] für mindestens eine Stunde	MAD ≥ 70 mmHg	MAD < 70 mmHg	Dopamin ≤ 5	Dopamin > 5/ Adrenalin ≤ 0,1/ Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamin > 15/ Adrenalin > 0,1/ Noradrenalin > 0,1
ZNS	Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Niere	Kreatinin mg/dl, Diurese ml/d	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 Diurese < 500	> 5,0 Diurese < 200

Zur schnellen Identifikation von Patienten mit einer Sepsis wurde für den ambulanten Gebrauch der sogenannte quick SOFA-Score entwickelt. (Seymour et al. 2016). Hier werden nur die drei Kriterien Veränderungen der Vigilanz (GCS < 15), systolischer Blutdruck (≤ 100 mmHg) und die Atemfrequenz (≥ 22/Min) betrachtet. Bei Vorliegen von zwei der Kriterien besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer Sepsis.

Bereits in diesem Stadium kann eine Sterblichkeit von etwa 10 % angenommen werden (Seymour et al. 2016). Das empfohlene Vorgehen bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion/Sepsis ist in Abbildung 1 dargestellt (Singer et al. 2016).

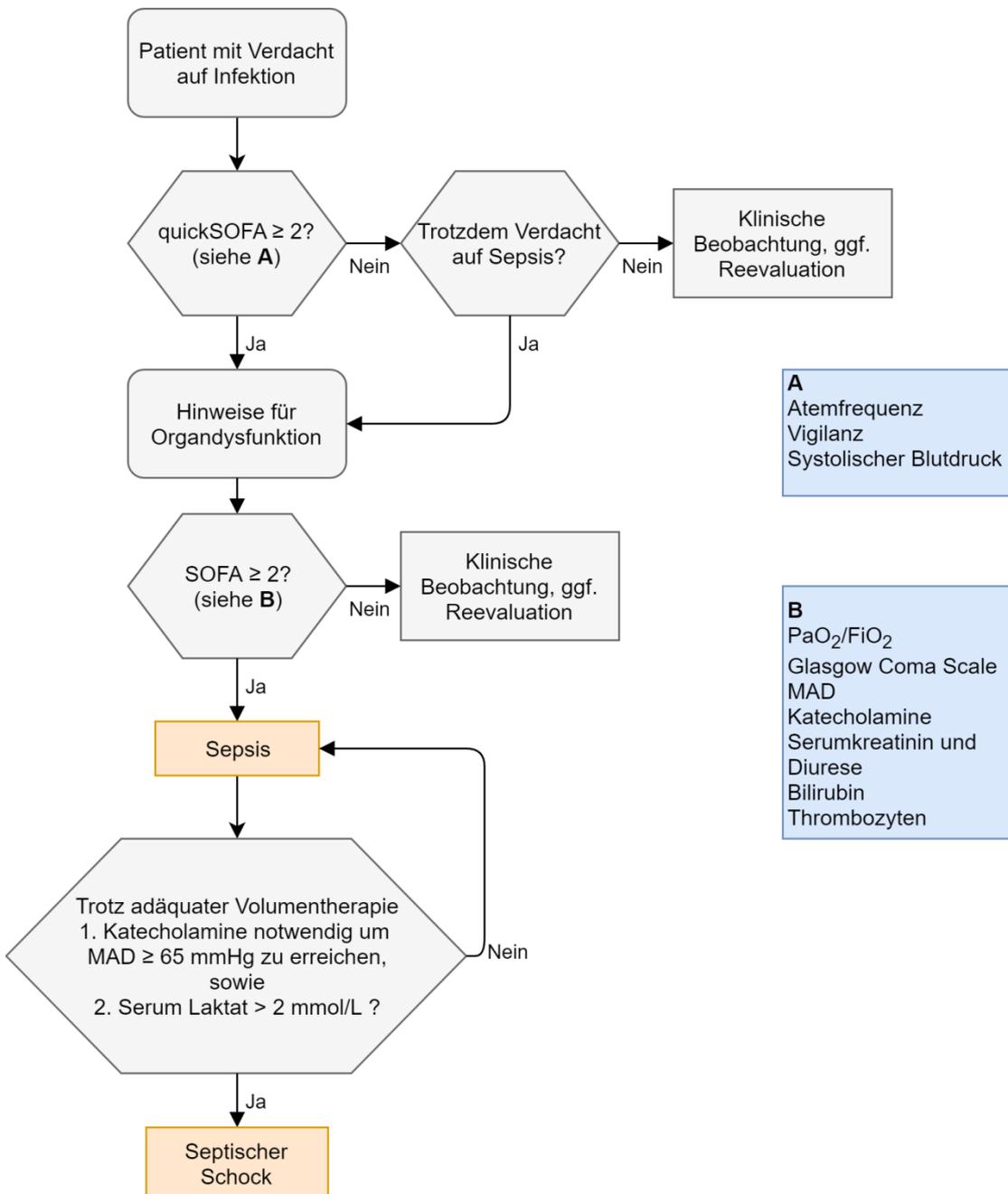


Abb. 1: Vorgehen bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion. Schema in Anlehnung an Singer et al. (2016)

2.4 Therapie

Obwohl die Sepsis schon seit Jahrzehnten im Fokus der Forschung steht und immer mehr Details der Pathophysiologie bekannt sind, konnte bisher keine neue Therapiemethode mit durchschlagendem Erfolg entwickelt werden (Angus 2011). Nach wie vor besteht die Therapie der Sepsis in der Identifizierung und wenn möglich, raschen Sanierung des Infektfokus und der Stabilisierung des Kreislaufs.

Sepsis und septischer Schock sind medizinische Notfälle (Rhodes et al. 2017; Singer et al. 2016). Die Behandlung in den ersten Stunden ist entscheidend für das Outcome des Patienten, ähnlich wie beim Polytrauma, Schlaganfall oder Myokardinfarkt, daher muss die Diagnose schnell erfasst und die Therapie umgehend begonnen werden. Ein standardisiertes, multiprofessionelles Screening für Sepsis bei akut kranken Hochrisikopatienten soll zur früheren Erkennung und somit verbesserten Behandlung der Sepsis beitragen (Rhodes et al. 2017).

Im Folgenden werden die Empfehlungen der aktuellen Sepsisleitlinie der Surviving Sepsis Campaign zusammengefasst (Rhodes et al. 2017).

Die Hypotonie durch Sepsis soll durch intravenöse Volumensubstitution mit Kristalloiden mit mindestens 30 ml/kg Körpergewicht innerhalb der ersten drei Stunden therapiert werden. Im Verlauf soll unter regelmäßiger Evaluierung des Volumenstatus weiter Volumen substituiert werden. Der Volumenstatus soll anhand klinischer Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck, Oxygenierung im Blut, Atemfrequenz, Temperatur und Diurese eingeschätzt werden. Auch eine Echokardiographie kann hier sehr hilfreich sein. Ein erweitertes hämodynamisches Monitoring, wie eine invasive arterielle Blutdruckmessung kann zusätzlich notwendig sein. Zusätzlich zu Kristalloiden kann Albumin substituiert werden. Ziel im septischen Schock ist ein arterieller Mitteldruck von mindestens 65 mmHg. Die Gabe von Katecholaminen kann hier erforderlich sein. Erste Wahl ist hier Noradrenalin, die Alternative ist Dopamin. Vasopressin oder Adrenalin können ergänzt werden. Außerdem soll die Laktatkonzentration normalisiert werden.

Die Identifizierung und Kontrolle des Infektfokus soll so schnell wie möglich erfolgen, weil eine frühe Therapie mit einer geringeren Mortalität einhergeht. Die schnelle Fokuskontrolle beinhaltet zum Beispiel das Wechseln möglicherweise infizierter

Katheter, sowie ggf. operative Verfahren, wie bei infiziertem Gewebe, intraabdominellen Entzündungen, Hohlorganperforationen oder entzündeten Implantaten. Sie soll innerhalb von 6 - 12 Stunden nach Diagnose erfolgen. Längere Zeitintervalle bis zur Fokuskontrolle erhöhen die Mortalität. Hier ist zu beachten, dass ein hämodynamisch instabiler Patient möglicherweise nicht operationsfähig ist und dass einer chirurgischen Intervention Komplikationen folgen können. So muss immer eine Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen und das schonendste Verfahren zur Fokuskontrolle gewählt werden.

Vor Beginn der antimikrobiellen Therapie sollen bei Patienten mit Verdacht auf Sepsis Proben zur mikrobiellen Untersuchung entnommen werden. Dies bedeutet mindestens zwei Paare Blutkulturen sowie je nach vermutetem Fokus zum Beispiel Liquor, Urin, Wundabstriche oder Trachealsekret. Die intravenöse antimikrobielle Therapie soll so schnell wie möglich und innerhalb einer Stunde nach Diagnose beginnen. Zunächst erfolgt eine empirische Breitspektrumtherapie in Form von mindestens zwei Substanzen, welche alle möglichen Pathogene, also Bakterien und ggf. auch Viren und Pilze abdecken. Zu beachten ist die möglicherweise notwendige Dosisanpassung des Antibiotikums, da eine Unterdosierung vermieden werden soll. Bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock liegen ein erhöhtes Verteilungsvolumen sowie veränderte Leber- und Nierenfunktionen vor, welche Dosisanpassungen notwendig machen können. Es wird die Therapiedauer von sieben bis zehn Tagen empfohlen, welche allerdings individuell angepasst werden muss. Die antimikrobielle Therapie soll täglich reevaluiert werden. Bei Erregeridentifikation wird die Therapie angepasst und möglichst deeskaliert. Als Verlaufsparemeter und um die Dauer der antimikrobiellen Therapie festzulegen, wird Procalcitonin empfohlen. Hydrocortison wird nur empfohlen, wenn Volumensubstitution und Katecholamintherapie nicht ausreichen, um hämodynamische Stabilität zu erzielen. Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten wird ab einem Hämoglobinwert unter 7 g/dl empfohlen. Liegen kardiovaskuläre Vorerkrankungen, eine akute Blutung oder eine schwere Hypoxämie (zentralvenöse Sauerstoffsättigung unter 70 %) vor, wird die Transfusionsindikation großzügiger gestellt. Bei Thrombozyten unter 10.000/ μ l wird die Gabe von Thrombozytenkonzentraten empfohlen. Zusätzlich soll Normoglykämie angestrebt werden und eine Thrombose- sowie eine Stressulcusprophylaxe und ggf. Nierenersatztherapie erfolgen.

Es wird eine frühe enterale Ernährung angestrebt. Bei beatmeten Patienten soll eine lungenprotektive Beatmung mit kleinen Tidalvolumina und höherer Atemfrequenz durchgeführt werden.

2.5 Experimentelle Sepsismodelle

Mit 25,3 % sind intraabdominelle Infektionen hinter Atemwegsinfektionen der zweithäufigste Infektfokus der schweren Sepsis in den USA und Europa (Brunkhorst 2006). Bei den intraabdominellen Infektionen kann man zwischen einer primären Peritonitis, ausgelöst durch hämatogene oder lymphogene Infektion und der sekundären Peritonitis unterscheiden. Die sekundäre Peritonitis entsteht auf dem Boden von Abszessen oder der Perforation intraperitonealer Organe. In der Regel liegen folgende abdominelle Erkrankungen der sekundären Peritonitis zu Grunde: Appendizitis, Cholezystitis, Sigmadivertikulitis, sowie Ileus und mesenteriale Ischämie. Aber auch iatrogene Ursachen wie eine Anastomoseninsuffizienz nach Darmchirurgie kann zu einer sekundären Peritonitis führen (Maier et al. 2005). Es handelt sich hier also um häufige Krankheitsbilder, die täglich in Kliniken behandelt werden. Die im Folgenden beschriebenen Sepsis-Modelle repräsentieren diese sekundäre Peritonitis im Tier.

2.5.1 LPS-Modell

Das LPS-Modell wurde in den 1950er Jahren entwickelt. Bei LPS handelt es sich um Lipopolysaccharide auf der Zellwand gram-negativer Bakterien, welche aus dem gewünschten Bakterienstamm isoliert werden können. Man nahm bei Entwicklung des Modells an, dass LPS der Hauptauslöser der gram-negativen Sepsis sei und so wurden verschiedene Tiermodelle zur Sepsisinduktion durch LPS entwickelt. LPS kann in verschiedener Dosierung i.v. oder i.p. injiziert werden. Es gibt sowohl die Möglichkeit der einmaligen als auch der mehrfachen oder der kontinuierlichen Injektion. Es handelt sich um ein Monoliganden-Modell, da nur ein Bestandteil des Bakteriums verwendet wird. Heute ist bekannt, dass die Wirtsreaktion auf Erreger als Antwort auf verschiedene *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) entsteht (Wiersinga et al. 2014).

LPS ist einer dieser PAMPs. Beim LPS-Modell wird häufig LPS aus nur einem Bakterienstamm, z.B. *E. coli* (Huet et al. 2013; Kozak et al. 1995; Liu et al. 2015; McCarron et al. 2015) verwendet, sodass eine monobakterielle, gram-negative Infektion ausgelöst wird.

2.5.2 CLP-Modell

1980 entwickelten Wichterman et al. das CLP-Modell zur Sepsisinduktion bei Ratten. Bei Mäusen ist es gleichermaßen anzuwenden. CLP steht für *Cecal Ligation and Puncture*. Die Sepsisinduktion erfolgt im Rahmen einer Operation in Narkose. Nach Eröffnen des Abdomens, wird das Caecum mit einem Faden ligiert. Nach Ligatur wird das Caecum punktiert. So kann Darminhalt austreten und eine Darmperforation simuliert werden. Es kommt also zur Infektion mit einem polymikrobiellen Bakterienspektrum. Das Abdomen wird durch eine Naht verschlossen. Das Volumen des Caecums, das ligiert wird, kann unterschiedlich groß gewählt werden. Ebenso können die Nadelgröße und Zahl der Punktionen variiert werden. So soll eine unterschiedliche Sepsisschwere erreicht werden. In einem weiteren chirurgischen Eingriff, kann das ligierte Caecum entfernt werden. So soll die Situation einer perforierten Appendizitis oder Divertikulitis mit anschließender chirurgischer Intervention imitiert werden.

2.5.3 CASP-Modell

Das CASP-Modell wurde von Zantl et al. (1998) etabliert. CASP bedeutet *Colon Ascendens Stent Peritonitis*. Bei der narkotisierten Maus wird das Abdomen eröffnet und das Colon ascendens hervorgeholt. Hier wird dann ein Stent eingebracht, sodass eine Verbindung des Coloninneren zum Intraperitonealraum geschaffen wird. Der Stent wird mit Nähten fixiert. Anschließend wird das Abdomen mit Nähten verschlossen. Auch im CASP-Modell kommt es zur Infektion mit einem polymikrobiellen Bakterienspektrum, ähnlich einer Darmperforation. Das Lumen des Stents kann variiert werden. Durch Variation der Stentgröße soll eine unterschiedliche Sepsisschwere induziert werden. Nach einem gewünschten Zeitraum kann der Stent durch erneutes Eröffnen des Abdomens in Narkose wieder entfernt werden.

2.5.4 IPSI-Modell

IPSI steht für intraperitoneale Stuhlinjektion (*Intraperitoneal Stool Injection*). Die Sepsisinduktion erfolgt durch eine intraperitoneale Injektion einer Stuhllösung, die unterschiedlich hergestellt werden kann. Im Gegensatz zum CLP- oder CASP-Modell kann bei IPSI die Bakterienzusammensetzung vor der Injektion untersucht werden. Erstmals beschrieben wurde der Vorgänger des IPSI-Modells 1974 von Weinstein et al. bei Ratten. Sie entnahmen Stuhl aus dem Caecum von Ratten und erstellten daraus eine Lösung, die in Gelatine-Kapseln gegeben wurde. Diese Kapseln wurden im Rahmen einer kleinen Operation in den Bauchraum der Ratten eingebracht. Lang et al. (1983) erstellten aus gesammelten Stuhlpellets eine Stuhllösung, die sie durch Laparotomie in den Bauchraum von Ratten einbrachten. In diesen ersten Modellen erfolgte die Sepsisinduktion also auch im Rahmen einer Operation mit Narkose. Neuere Arbeiten, wie auch diese, zeigen, dass es auch möglich ist, eine Stuhllösung herzustellen, die minimalinvasiv intraperitoneal verabreicht werden kann (Brealey et al. 2004; Wynn et al. 2007; McCarron et al. 2015; Shrum et al. 2014). Andere Autoren bezeichnen diese Art des Sepsismodells auch als *“fecal slurry”* (Brealey et al. 2004), oder *“cecal slurry”* (Lewis et al. 2016; Wynn et al. 2007).

2.6 Ziel der Arbeit

Die Sepsis ist ein häufiges Krankheitsbild mit einer weiterhin hohen Mortalität bis zu 60 % (Fleischmann et al. 2016), dessen Pathophysiologie noch nicht vollständig verstanden ist (Singer et al. 2016).

Ziel der Arbeit war die Etablierung der kontrollierten Sepsisinduktion per intraperitonealer Stuhlinjektion (IPSI) im Mausmodell, um den genauen Verlauf, auch in Hinsicht auf neue Therapiemöglichkeiten und die Zytokinausschüttung, untersuchen zu können. Es sollte eine polymikrobielle Sepsis erzeugt werden. Diese sollte minimalinvasiv induziert werden. Das Modell sollte durch Variation der Verdünnung des injizierten Stuhls gut steuerbar sein. Des Weiteren sollte die Krankheitsschwere der Sepsis anhand nichtinvasiv erhobener klinischer Parameter beurteilbar sein.

3. Methoden und Material

3.1 Sterilität

Bei allen Arbeiten mit den Tieren wurden Bereichskleidung und Handschuhe getragen. Flächen und OP-Besteck wurden nach jeder einzelnen Stuhlentnahme desinfiziert. Die Handschuhe wurden nach jeder einzelnen Stuhlentnahme gewechselt und zusätzlich desinfiziert. Bei Stuhlentnahme und Stuhlausstrich wurde zusätzlich ein Mundschutz getragen.

3.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen C57BL/6 Mäusen der Züchter Charles River, Harlan und Janvier durchgeführt. Mäuse von Janvier dienten nur als Kontrolltiere. Die Mäuse waren im Mittel 10 Wochen alt und wurden vor den Versuchen 1 - 2 Wochen im Tierhaus des Universitätsklinikums, Haus für Experimentelle Therapie (HET) Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn, eingestallt. Alle Versuche erfolgten konform mit dem Tierschutzgesetz.

Das Tierversuchsvorhaben wurde mit Aktenzeichen 84-02.04.2013.A071 vom LANUV NRW genehmigt.

3.2.1 Haltung

Die Haltung der Mäuse im HET erfolgte unter folgenden Bedingungen.

Beleuchtung	200 Lux auf 1 Meter (m) Höhe
Hell- / Dunkelphase	07:00 - 19:00 Uhr Hell / 19:00 - 07:00 Uhr Dunkel
Relative Luftfeuchtigkeit	~50 % (30 bis 70 %)
Luftwechselrate	15-fach pro Stunde (h)
Raumtemperatur	22 °C (+/- 2 °C)
Käfigart	Filtertop-Käfigsysteme, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg, Einstreu wurde vor Nutzung autoklaviert
Futter und Wasser	ad libitum; vor Nutzung autoklaviert
Futter	ssniff Haltungsdiet Maus (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland);
Besatzdichte	5 Tiere pro Käfig

3.2.2 Stuhldonoren und Stuhlrezipienten

Da Einstellungs- und insbesondere Futterbedingungen die Stuhlzusammensetzung beeinflussen können, wurden Mäuse, die ausschließlich als Stuhldonoren verwendet wurden, nicht eingestallt. Sie verblieben nach Lieferung in der Transportbox und wurden direkt in das Labor im HET gebracht. Hier erfolgte die Stuhlentnahme innerhalb von zwei Stunden nach Anlieferung der Tiere im HET.

3.2.3 Analgesie

Entsprechend der Angaben im Tierversuchsvorhaben erfolgte die Analgesie mit Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma GmbH). 1 ml Buprenorphin (0,3 mg/ml) wurde zu 5 ml NaCl (0,9 %) gegeben. Von dieser Lösung wurden 2 µl/g Körpergewicht subkutan in den Nacken injiziert. Die erste Injektion erfolgte direkt nach IPSI und dann alle 12 Stunden bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.4 Atlanto-okzipitale Dislokation unter Anästhesie mit Isofluran

Die Euthanasie erfolgte durch atlanto-okzipitale Dislokation unter Anästhesie mit Isofluran 2,5-3 Vol/% (O₂-Flow 1 l/min, Forene, Abbott GmbH, Ludwigshafen, Deutschland). Isofluran wurde in eine Narkosebox geleitet. Die Maus verblieb in der Box bis sie eindeutig anästhesiert war. Zeichen hierfür waren die verlangsamte Atmung, die veränderte Körperhaltung, wobei die Maus häufig auf der Seite lag, und die fehlende Reaktion auf Schmerzreize. Anschließend wurde die auf dem OP-Tisch sitzende Maus am Schwanz gehalten, während mit einer Pinzette Druck auf den Nacken ausgeübt und so das atlanto-okzipitale Gelenk disloziert wurde.

3.3 Entnahme von Stuhl und Peritoneallavage

3.3.1 Eröffnung des Abdomens

Die Eröffnung des Abdomens erfolgte zur Entnahme von Stuhl und zur Peritoneallavage. Die euthanasierte Maus wurde in Rückenlage gebracht. Es folgte die Desinfektion des Abdomens der Maus mit 70 %igem Ethanol. Die Bauchdecke wurde eröffnet, indem mit einer Pinzette das Fell angehoben und ein Hautschnitt von circa 1 cm Länge vorgenommen wurde. Dieser wurde manuell erweitert. Hierbei wurde das Peritoneum verschont.

3.3.2 Stuhlentnahme aus dem Caecum

Für die Stuhlentnahme bei der euthanasierten Maus wurde nach Eröffnen des Abdomens das Peritoneum mit Hilfe einer Schere eröffnet. Mit einer Pinzette wurden die Darmschlingen aus dem rechten unteren Quadranten des Abdomens mobilisiert und hervorgezogen, um das Caecum zu fassen. Das Caecum wurde mit einer Schere am „blinden Ende“ eröffnet, sodass der Stuhlinhalt aus einem Abschnitt von circa 1 cm des „blinden Endes“ in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben werden konnte. Es wurden so pro Maus 0,1 - 0,2 g Stuhl entnommen.

3.3.3 Peritoneallavage

Die Peritoneallavage erfolgte nach Eröffnung des Abdomens der euthanasierten Maus unter Verschonung des Peritoneums. Das unverletzte Peritoneum wurde mit einer Pinzette angehoben, sodass mit einer 21 G Kanüle 3 ml einer sterilen 0,9 %igen Natriumchloridlösung in den Intraperitonealraum injiziert werden konnten. Hierbei war darauf zu achten, keine Organe zu verletzen. Zur Verteilung der Natriumchloridlösung wurde die Maus zu allen Seiten geneigt. Anschließend wurde mit einer Schere ein circa 0,5 cm langer Schnitt ins Peritoneum vorgenommen, wobei keine Flüssigkeit austreten sollte. Ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde direkt auf die Öffnung gehalten, sodass die Peritoneallavage nun direkt in das Reaktionsgefäß fließen konnte (ca. 1 - 1,5 ml). Die Peritoneallavage wurde auf CHROMagar MH Orientation™ (Mast Diagnostica) ausgestrichen.

3.4 Mikrobiologische Untersuchungen

3.4.1 Drei-Ösen-Ausstrich

Zur Untersuchung der Bakterienzusammensetzung wurden Stuhl und Peritoneallavage in gleicher Weise auf CHROMagar MH Orientation™-Platten ausgestrichen. Dies erfolgte mit Hilfe von Plastikösen in Form eines Drei-Ösen-Ausstriches, wie in Abbildung 2 dargestellt.

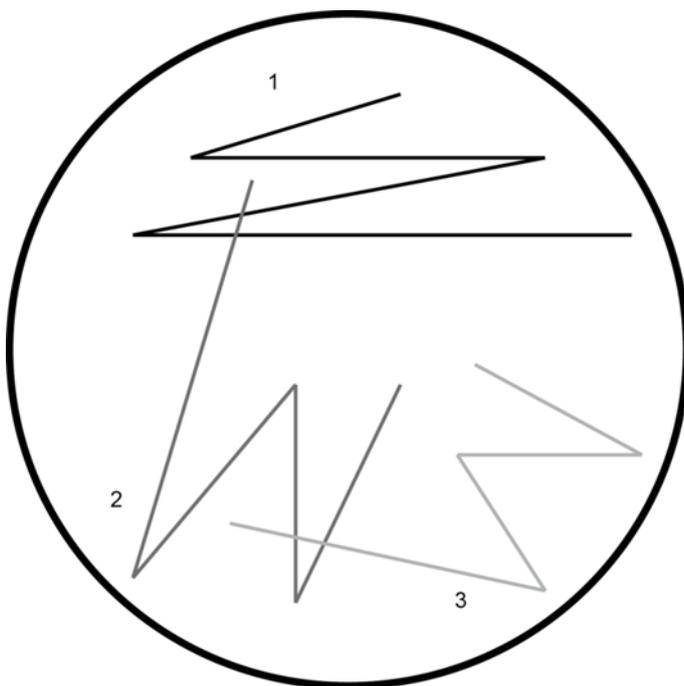


Abb. 2: Technik 3-Ösen-Ausstrich: Der erste und der zweite Strich wurden mit derselben Öse durchgeführt. Für den dritten Strich wurde eine weitere Öse verwendet.

3.4.2 Bebrütung der beimpften Agarplatten

Die Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 36 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 75 % im Brutraum des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn (AöR) Sigmund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn, entsprechend dem Institutsstandard bebrütet.

3.4.3 CHROMagar™ MH Orientation (Mast diagnostica)

Auf CHROMagar™ MH Orientation-Platten ausgestrichen stellen sich Bakterienstämme unterschiedlich dar. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Form, sondern auch in ihrer Farbe, sodass Bakterienstämme durch Blickdiagnose identifiziert werden können. Das Spektrum einer polymikrobiellen Probe, wie zum Beispiel einer Stuhlprobe, kann so unkompliziert dargestellt werden. Auf dem von uns verwendeten CHROMagar™ MH Orientation lassen sich laut Hersteller *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, Streptokokken der Gruppe B, Enterokokken und die als „KESC“ zusammengefassten Stämme *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* und *Citrobacter* unterscheiden (siehe Abb. 3).

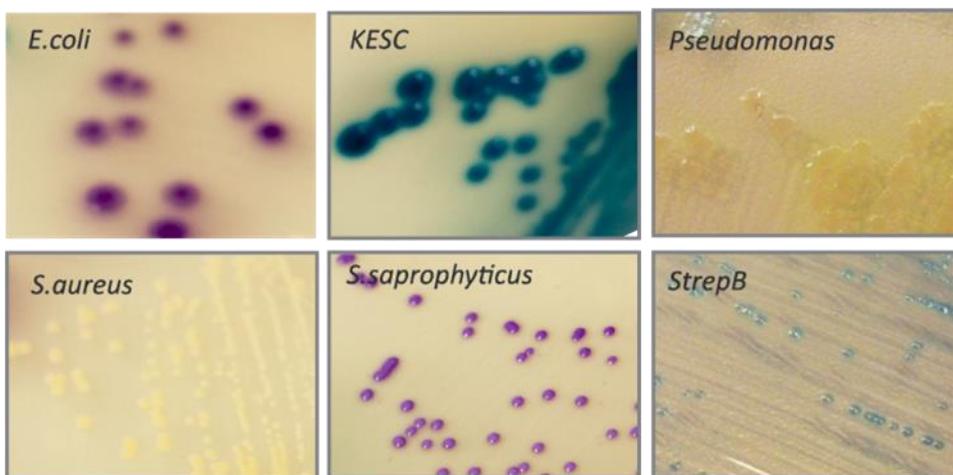


Abb. 3: Darstellung verschiedener Bakterienkolonien auf CHROMagar™ MH Orientation (CHROMagar 2017)

In unseren Untersuchungen zeigten sich Abweichungen zu den Herstellerangaben. Es war uns aber dennoch möglich, Bakterienstämme verlässlich zu identifizieren.

E. coli wächst nach Herstellerangaben rosa, zeigte sich in unseren Untersuchungen auch weiß/durchsichtig oder blau/durchsichtig. Am besten waren *E. coli* durch die eindeutige Morphologie (gewellter Rand und stärker gefärbter Punkt in der Mitte) zu identifizieren.

Staphylococcus aureus wächst nach Herstellerangaben golden, zeigte sich in unseren Versuchen in der Regel klein, weiß oder gelb.

Der „KESC“-Gruppe des Herstellers (Klebsiella, Enterobacter, Serratia und Citrobacter) fügten wir auch die Enterokokken hinzu, da uns hier keine zuverlässige Unterscheidung möglich war. Diese Gruppe bezeichnen wir als „KEESC“. Diese Bakterienstämme wuchsen alle als blaue Kolonien auf CHROMagar™ MH Orientation. Eine weitere Differenzierung war uns nicht möglich.

3.4.4 Semiquantitative Auswertung der bebrüteten CHROMagar™-Platten

Die Beurteilung des Bakterienwachstums auf den CHROMagar™ MH Orientation-Platten erfolgte mit Unterstützung durch die Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn, insbesondere durch Frau PD. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding und Herrn Dr. med. Marijo Parcina.

Nach der Bebrütung für 48 Stunden erfolgte die Auswertung der Kulturplatten semiquantitativ, wobei der Bakterienbewuchs als wenig, mittel oder reichlich bezeichnet wurde. Entsprechend wurden je nach Bakterienbewuchs Punkte vergeben (wenig=1; mäßig=2; reichlich=3).

Wenig Bewuchs bedeutete, dass sich die Kolonien nur im ersten Strich befanden (siehe Abb. 4). Bei mäßigem Bewuchs (Abb. 5) fanden sich auch Kolonien im zweiten Strich und bei reichlichem Bewuchs (Abb. 6), lagen auch im dritten Strich Kolonien vor.

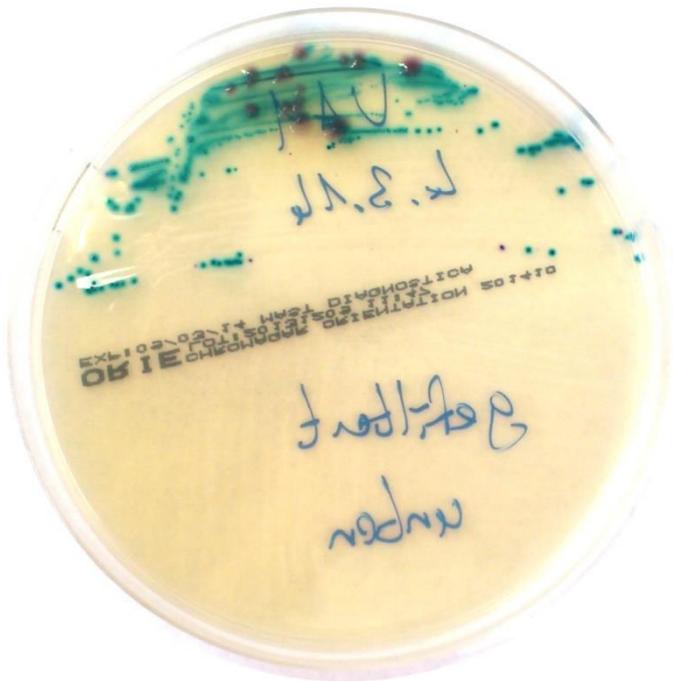


Abb. 4: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit wenig Bewuchs. Der Bewuchs ist als wenig zu bezeichnen, weil sich nur im ersten Strich Kolonien befinden.

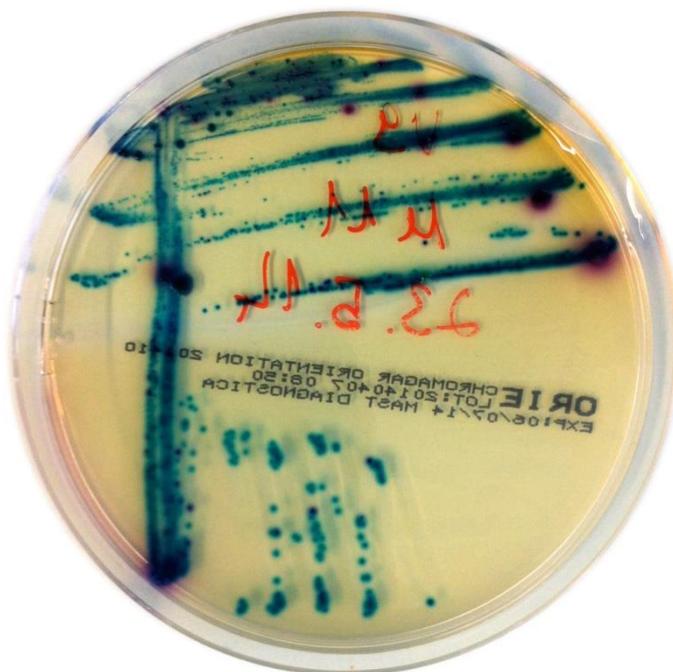


Abb. 5: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit mäßigem Bewuchs. Der Bewuchs ist als mäßig zu bezeichnen, weil sich im ersten und im zweiten Strich Kolonien befinden.



Abb. 6: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit reichlichem Bewuchs. Der Bewuchs ist als reichlich zu bezeichnen, weil sich in allen drei Strichen Kolonien befinden.

3.4.5 Auswertung der bebrüteten CHROMagar™-Platten mit der MALDI-TOF-MS

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Ausstriche auf CHROMagar™ MH Orientation erfolgten stichprobenartig Untersuchungen von Bakterienkolonien mit der MALDI. MALDI steht für *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*, auf Deutsch also Matrix unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise durch die Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der Uniklinik Bonn durchgeführt. Bei der MALDI handelt es sich um ein massenspektrometrisches Verfahren. Eine Probe der zu identifizierenden Kolonie wird zusammen mit einer Matrixlösung auf eine MALDI-Probenplatte gegeben. Im MALDI-TOF-MS-Gerät wird dann in einem Hochvakuum ein Laserstrahl auf die Probenplatte gelenkt. Hierdurch verdampfen Matrix und die enthaltenen Mikroorganismen explosionsartig. Dies führt zur Ionisierung der Proteine dieser Mikroorganismen.

In einem elektrischen Feld wird dann die Flugzeit der so beschleunigten Proteine ermittelt. So lässt sich ein Gesamtspektrum der zu untersuchenden Erreger darstellen, welches speziesspezifisch ist und einen „molekularen Fingerabdruck“ (Barbuddhe et al. 2008), der Erreger darstellt. In Abbildung 7 zeigen Zhu et al. (2016) jeweils das spezifische Gesamtspektrum von *E.coli*, *Bacillus subtilis* und *S. aureus* in verschiedener Zellzahl. Nachdem zu Beginn unserer Versuche die Untersuchung in der MALDI-TOF-MS unsere Ergebnisse der Bakterienidentifikation auf dem CHROMagar™ MH Orientation bestätigen konnte, wurde sie später nicht mehr eingesetzt.

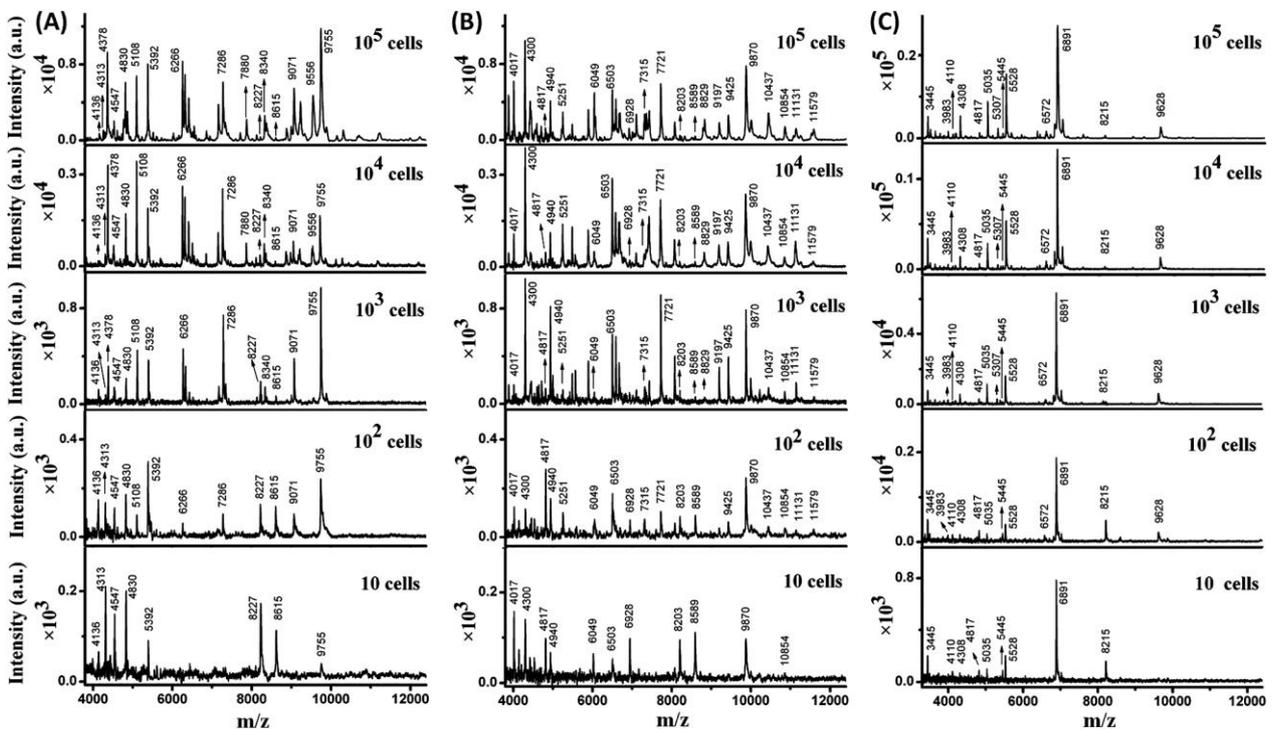


Abb. 7: MALDI-TOF MS Gesamtspektrum von A) *E.coli*, B) *Bacillus subtilis*, C) *S. aureus* in unterschiedlicher Zellzahl (Zhu et al. 2016)

3.5 Präparation des Stuhls zur Injektion

3.5.1 Stuhllagerung

Die Lagerung des Stuhls erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder 15 ml Falkontubes im Labor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn. In Vorversuchen untersuchten wir die Stuhllagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für die Versuche, in denen Stuhl zur IPSI injiziert wurde, wurden Stuhl und vorbereitete Stuhlverdünnung immer bei $4 - 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.2 Herstellung von Filtern zur Stuhlfiltration

Da der Stuhl unbearbeitet nicht injizierbar ist, wurde von uns ein Filtersystem etabliert. Für einen Filter wurden eine sterile 1000 μl Pipettenspitze mit Filter (Axygen[®]) sowie ein 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) verwendet (Abb. 8). Die Pipettenspitze wurde mit einer desinfizierten Schere bei einer Länge von etwa 2 cm abgeschnitten und der Deckel des Reaktionsgefäßes abgetrennt. Der Teil der Pipettenspitze mit dem Filter wurde in das Reaktionsgefäß eingesetzt.



Abb. 8: Filterherstellung: A: Materialien zur Herstellung eines Filters: sterile 1000 μl Pipettenspitze, 2 ml Reaktionsgefäß desinfizierte Schere. B: Die Pipettenspitze wird bei einer Länge von etwa 2 cm abgeschnitten und der Deckel des Reaktionsgefäßes entfernt. C: Die abgeschnittene Pipettenspitze wird in das Reaktionsgefäß eingesetzt.

3.5.3 Stuhlverdünnung und -filterung

Der Stuhl wurde gepoolt und gewogen, anschließend erfolgte eine 1:3 Verdünnung mit steriler Natriumchloridlösung (0,9 %ig) (1 Teil Stuhl + 2 Teile NaCl). Je 400 µl verdünnter Stuhl wurden in die vorbereiteten Filter gefüllt und in der Tischzentrifuge (Eppendorf) für einige Sekunden bis auf 1000 rpm zentrifugiert bis ein Filtrat unterhalb und eine halbfeste Phase oberhalb des Filters erkennbar waren.

Der Überstand oberhalb des Wattefilters wurde mit einer Pipette abgenommen. Anschließend konnte die Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß entfernt und der gefilterte Stuhl abpipettiert werden.

Für die Injektion von je 200 µl 1:3 verdünnter Stuhllösung bei 10 Mäusen wurde der Stuhl von 20 Mäusen entnommen und aufbereitet. Die gewonnene Lösung wurde in ein 15 ml Tube gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 - 6 °C gelagert.

3.5.4 Stuhlinjektion, Kontroll- und Sham-Gruppe

In dieser Arbeit wurden die Mäuse in den Versuchen in insgesamt fünf Gruppen eingeteilt:

Die Kontrollgruppe erhielt keinerlei Injektion.

Die Sham-Gruppe erhielt 200 µl sterile Natriumchloridlösung (0,9 %), um die Reaktion auf die intraperitoneale Injektion an sich zu quantifizieren.

Die Stuhlinjektion erfolgte in drei Gruppen, entweder in der Verdünnung 1:3, 1:6 oder 1:9.

Um eine Injektion von zu kalter Flüssigkeit zu vermeiden, wurde die bei 4 - 6 °C gelagerte Stuhlverdünnung etwa 10 Minuten vor Injektion aus dem Kühlschrank genommen. Das Injektionsvolumen betrug 200 µl.

Die Injektionen erfolgten bei der wachen Maus intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten des Abdomens. Es wurden 1 ml Spritzen mit 21 G Kanülen verwendet. Die Injektion in einer zusammengehörigen Gruppe erfolgte aus derselben Spritze und Kanüle. Wir führten die Injektionen abends durch.

3.6 Beurteilung des Krankheitsverlaufs nach IPSI

3.6.1 Erhebung des Krankheitsscores

Um den Krankheitsgrad der Mäuse nach IPSI zu beurteilen und zu vergleichen, wurde ein Krankheitsscore nach einheitlichen Kriterien erhoben. Die Bewertung der Tiere erfolgte verblindet durch eine dritte Person nach folgendem Protokoll, welches in Anlehnung an Morton und Griffiths (1985) von Schleifer (2015) etabliert wurde.

Protokoll zur Beobachtung des Krankheitsgrades im Verlauf nach IPSI									
Maus:					Stuhl:				
Injektionsdatum:					Konzentration:				
Ausgangsgewicht:									
Temperatur:									
Datum:	Uhrzeit:			Stunden nach Injektion:					
Körperhaltung:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1,5	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2,5	<input type="checkbox"/> 3		
Körperpflege:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1,5	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2,5	<input type="checkbox"/> 3		
Bewegung/Verhalten:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1,5	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2,5	<input type="checkbox"/> 3		
Gewicht:									
Temperatur:									
<u>Körperhaltung:</u>	0 Punkte: normale Bewegung, Laufen, Strecken. Punkte, wenn: unnormale Haltung, Verkrampfung, Lähmungen, hoher Muskeltonus, Buckel								
<u>Körperpflege:</u>	0 Punkte: Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend, vollständig geöffnet. Punkte, wenn: Fell stumpf, ungeordnet, aufgestellt; ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb,								
<u>Bewegung/ Verhalten:</u>	0 Punkte, wenn normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte). Punkte, wenn: ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik, Selbstisolation oder Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörung, Autoaggression								

Abb. 9: Protokoll zur Beobachtung des Krankheitsgrades im Verlauf nach IPSI

Die Beurteilung erfolgte je nach Versuchsdauer 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden nach IPSI. Eine Langzeituntersuchung nach IPSI erfolgte über 48 Stunden. Hier wurde der Krankheitsscore alle 4 Stunden erhoben. Deutliche Krankheitszeichen zeigten sich 8 - 12 Stunden nach IPSI. In den drei Kategorien Körperhaltung, Körperpflege, Bewegung/Verhalten wurden jeweils 0 bis 3 Punkte, im Intervall von 0,5, vergeben und addiert. Eine gesunde, unauffällige Maus hatte einen Score von 0. Hier fand sich eine normale Körperhaltung. Das Fell war glänzend und, genau wie die Körperöffnungen, sauber. Die Tiere schliefen mit Körperkontakt zueinander. Sie waren leicht erweckbar und waren dann aktiv und neugierig. Ein mittlerer Score von 4,5 kann sich unterschiedlich zusammensetzen. Häufig zeigten diese Tiere ein struppiges Fell, einen verklebten Anus und verklebte Augen. Sie machten einen leichten Buckel und zeigten ein verändertes Gangbild. Mäuse mit einem mittleren Score waren etwas schwieriger zu erwecken, liefen dann aber durchaus auch umher und zeigten Neugierde ähnlich den gesunden Tieren. Bei einem Wert von 9 war der Maximalscore erreicht, welcher zum Abbruch des Versuchs führte. Bei Mäusen mit einem Krankheitsscore von 9 waren zusätzlich Bewegung und Verhalten stark beeinträchtigt. Die Körperhaltung war verkrampft und die Mäuse machten einen Buckel. Sie waren apathisch und reagierten kaum auf Berührung und Hochheben. Häufig saßen sie auch voneinander isoliert im Käfig. Falls sie liefen, war der Gang schwankend, sehr langsam und wirkte unkoordiniert.

3.6.2 Temperaturmessung

Die Temperatur wurde rektal bei der wachen Maus gemessen. Hierbei wurde die Maus am Rückenfell gehalten und die Temperatursonde circa 1 cm tief ins Rektum eingeführt.

3.6.3 Wiegen

Das Wiegen erfolgte bei der wachen Maus.

3.6.4 Abbruchkriterien

Wir definierten einen Krankheitsscore von 9 als Abbruchkriterium. Zusätzlich wurde eine Gewichtsabnahme um mehr als 20 % oder eine Temperaturabweichung von mehr als 2 °C, jeweils von den Ausgangswerten, als Abbruchkriterium definiert. Außerdem wurden eine stark verlangsamte Atmung oder eine Schnappatmung als Abbruchkriterium angesehen. Erfüllte eine Maus eines der Abbruchkriterien, wurde der Versuch für sie beendet und es erfolgte umgehend die Euthanasie.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, sowie die graphische Darstellung erfolgten mit Hilfe des Programms Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Um die Mittelwerte verschiedener Gruppen zu vergleichen, wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Bei Untersuchung der gleichen Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Die Überlebenskinetik wurde in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$.

3.8 Material

Gerät/Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
Buprenorphin	Temgesic [®] Injektionslösung	Essex Pharma GmbH	München, Deutschland
CHROMagar™	CHROMagar™ MH Orientation	Mast diagnostica	Reinfeld, Deutschland
Ethanol	70 %	Otto Fischar GmbH & Co KG	Saarbrücken, Deutschland
Falkontubes	Cellstar [®] Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
Handschuhe	Nitrile Powder-Free	Ansell, Micro- Touch [®]	Richmond, Australien
Isofluran	Forene [®] , 100 %	Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Isofluran- Verdampfer	IsoFlo [®]	Eickemeyer Electronic and Components GmbH	Kalefeld, Deutschland
Kanülen	21 G	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Mehrzwecktücher	zetBox [®]	ZVG Zellstoff- Vertriebs-GmbH & Co. KG	Troisdorf, Deutschland
NaCl	0,9 %, steril, 1000 ml	Braun AG	Melsungen, Deutschland
Oberflächen- desinfektion	Freka [®] -NOLA-T	Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld, Deutschland
OP-Besteck	Pinzetten, Scheren	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Research 1000 µl, 100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen	1000 µl, 100 µl RNase/DNase frei	Maxymum Recovery™, Axygen®	Corning, NY, USA
Plastikösen	Inoculation Loop, 10 µl	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Spritzen steril	1 ml, 5 ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sterilisator	Steri 250	Simon Keller	Burgdorf, Schweiz
Temperatursonde	Rectal Probe „RET-3“ for mouse	Physitemp Instruments INC	Clifton, NJ, USA
Thermometer	Homeothermic Controller Type 874	Hugo Sachs Elektronik	March, Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
 Tubes für Filter	2 ml, Clear	Maxymum Recovery™, Axygen®	Corning, NY, USA
Tupfer	Mulltupfer	Nobamed Paul Danz AG	Wetter, USA
Vortex	Vortex-Genie2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Waage	Electronic Balance Type ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen des zur IPSI verwendeten Stuhls

Zur Untersuchung der interindividuellen Unterschiede wurde der Stuhl von 20 Mäusen aus einer Lieferung einzeln ausgestrichen und auf das Vorkommen von Bakterienstämmen untersucht. Die Mäuse wurden vor der Stuhlentnahme nicht im Tierhaus (HET) eingestallt. Etwaige Stuhlveränderungen durch geänderte Futter- und Einstellungsbedingungen sollten so vermieden werden.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, waren die KEESC-Gruppe (Klebsiella, Enterobacter, Enterococcus, Serratia, Citrobacter) sowie *S. saprophyticus* im Stuhl von allen Mäusen vorhanden. Im Stuhl von 80 % der Mäuse fand sich *S. aureus* und bei 20 % *E. coli*. Es zeigten sich somit erhebliche interindividuelle Unterschiede innerhalb einer Lieferung von Mäusen vom selben Züchter, bei gleichem Alter und gleichen Einstellungs- und Fütterungsbedingungen. Um zu gewährleisten, dass in der Sepsisinduktion durch IPSI einheitlich zusammengesetzter Stuhl injiziert werden konnte, war es notwendig den entnommenen Stuhl zu poolen.

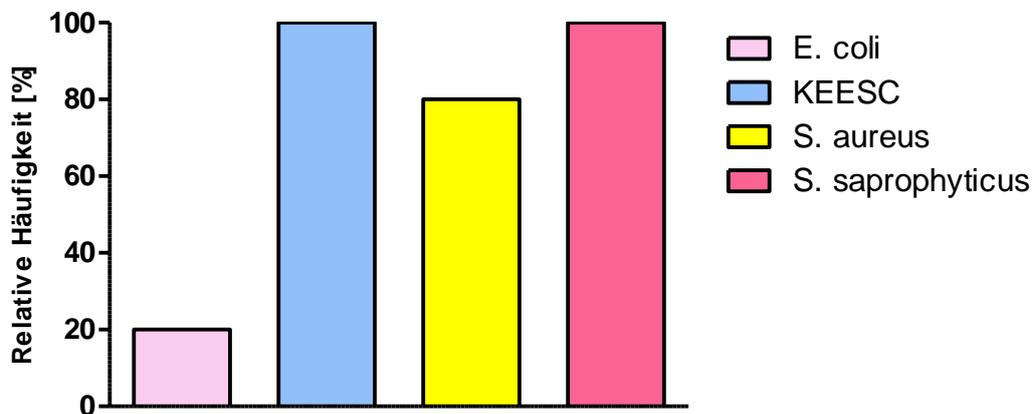


Abb. 10: Relative Häufigkeit des Vorkommens der Bakterienstämme in den Stuhlproben von 20 Mäusen: Die Stuhlproben von 20 Mäusen einer Kohorte wurden sofort nach Entnahme einzeln ausgestrichen und auf das Vorkommen der angegebenen Bakterienstämme untersucht. Dargestellt ist die relative Häufigkeit des Vorkommens der Bakterien in allen Stuhlproben. Die Quantität der Bakterienkolonien auf den Kulturplatten ist nicht dargestellt. n=20.

4.1.1 Ausstriche der verschiedenen Stuhlverdünnungen

Der Stuhl von 25 Mäusen wurde unbearbeitet, sowie bearbeitet (siehe Methodenteil) in den zur Injektion verwendeten Verdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9 ausgestrichen. Im Vergleich von frischem Stuhl und den Verdünnungen konnte nach 48-stündiger Bebrütung kein signifikanter Unterschied bezüglich der Bakterienquantität festgestellt werden. Die unterschiedliche Pathogenität der verschiedenen Stuhlverdünnungen im IPSI-Modell ließ sich jedoch durch die klinischen Parameter Gewicht, Temperatur und Krankheitsscore (Abb. 17-19) objektivieren. Der Unterschied der Pathogenität lässt sich mit der Quantifizierung durch einen 3-Ösen-Ausstrich nicht darstellen.

4.2 Stuhllagerung

Für umfangreiche Versuche mit dem IPSI-Modell wird eine große Menge von einheitlichem Stuhl benötigt, um die Versuchsbedingungen konstant zu halten. Dafür muss der Stuhl im Vorfeld entnommen und gelagert werden. Deswegen wurde initial die Auswirkung verschiedener Lagerbedingungen im Hinblick auf Veränderungen der Bakterienquantität getestet.

4.2.1 Lagerung bei -20 °C

Zunächst wurde der Einfluss des Einfrierens des Stuhls bei -20 °C auf die Bakterienquantität untersucht. Der frisch entnommene Stuhl von 20 Mäusen wurde gepoolt. Eine Probe wurde entnommen und direkt ausgestrichen. Nach 30-tägiger Lagerung bei -20 °C wurde eine weitere Probe des gleichen Stuhls ausgestrichen. Es zeigte sich eine Veränderung der Bakterienquantität (Abb. 11). E.coli Kolonien waren im eingefrorenen Stuhl auf CHROMagar™ MH Orientation nicht mehr nachweisbar. Auch das Wachstum von S. aureus Kolonien war deutlich reduziert. Auf das Wachstum der Bakterien aus der KEESC Gruppe sowie auf die Koloniebildung von S. saprophyticus hatte das Einfrieren keinen Einfluss. Das Einfrieren des Stuhls bei -20 °C führte zu einem kompletten Wegfall des E.coli Anteils und einer deutlichen Reduktion des S. aureus Anteils, wodurch sowohl die quantitative als auch die qualitative Zusammensetzung des Stuhls verändert wurde.

Die Lagerung des Stuhls bei -20 °C stellt somit keine für das IPSI-Modell geeignete Lagerungsmethode für die Stuhlpräparationen dar.

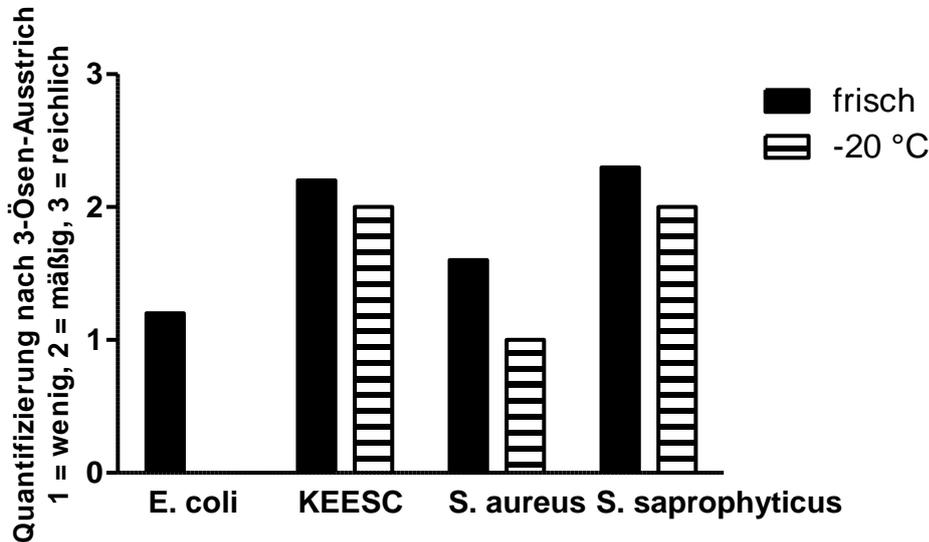


Abb. 11: Vergleich der Bakterienquantität in frischem Stuhl und nach Lagerung bei -20 °C: Der frische Stuhl von 20 Mäusen wurde einzeln ausgestrichen. Hier sind die Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung für die einzelnen Bakterienstämme dargestellt. Nach 30-tägiger Lagerung bei -20 °C wurde der gepoolte Stuhl erneut ausgestrichen. Die Ausstriche wurden als 3-Ösen-Ausstriche auf CHROMagar™ MH Orientation ausgeführt. n=20.

4.2.2 Lagerung bei 4 - 6 °C

Der injizierte Stuhl soll möglichst der ursprünglichen Zusammensetzung bei Entnahme entsprechen. Da dies durch Einfrieren des Stuhls nicht erreicht werden konnte, wurde die Veränderung der Bakterienquantität nach Lagerung bei 4 - 6 °C analysiert. Der frische Stuhl von fünf Mäusen wurde gepoolt und ausgestrichen. Im Verlauf von 96 Stunden Lagerung bei 4 - 6 °C wurden Proben entnommen und ausgestrichen. Diese wurden mit dem Ausstrich des frischen Stuhls verglichen. Die Bakterienquantität veränderte sich während dieser Lagerungszeit nicht signifikant. Da die Untersuchung der Bakterienzusammensetzung des Stuhls in unseren Versuchen nach 48 Stunden Bebrütung erfolgte, ist es möglich, diese ohne lagerungsbedingte Veränderung der Stuhlzusammensetzung, vor Injektion, durchzuführen.

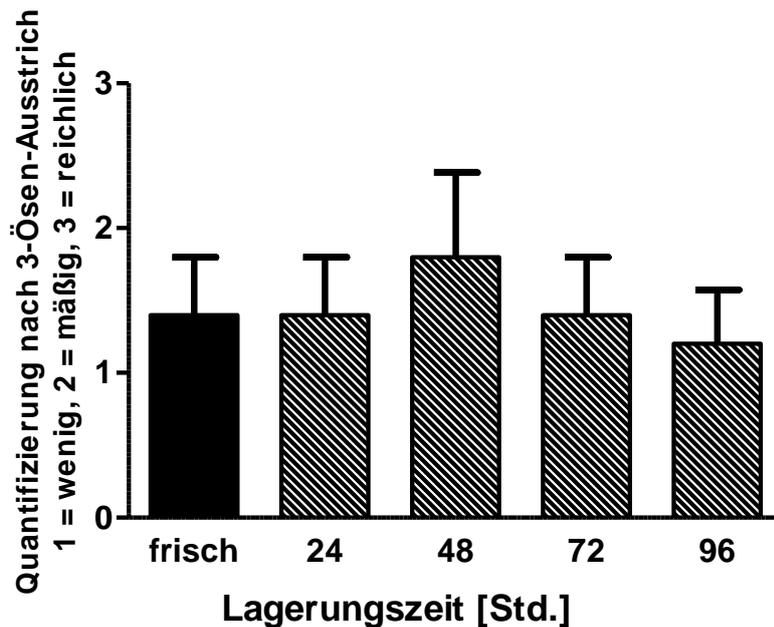


Abb. 12: Bakterienquantität einer Stuhlprobe im Verlauf der Lagerung bei 4 - 6 °C: Der frische Stuhl von fünf Mäusen wurde gepoolt und ausgestrichen. Im Verlauf von 96 Stunden Lagerung bei 4 - 6 °C wurden Proben entnommen und ausgestrichen. Die Ausstriche wurden als 3-Ösen-Ausstriche auf CHROMagar™ MH Orientation ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung (wenig=1; mäßig=2; reichlich=3) des Bewuchses der Stämme: *E. coli*, *KEESC*, *Proteus*, *S. aureus* und *S. saprophyticus*. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. n=5, gepaarte t-Tests.

4.3 Einfluss der Stuhlbearbeitung auf die Bakterienquantität und -qualität

Zur Herstellung einer injizierbaren Lösung wurde der entnommene Stuhl gefiltert und verdünnt, wie im Methodenteil detailliert erläutert. Der Einfluss der einzelnen Bearbeitungsschritte auf die Bakterienquantität wurde in den folgenden Versuchen überprüft.

Der entnommene Stuhl ist pur nicht intraperitoneal injizierbar, weil er durch den hohen Anteil an Ballaststoffen 21 G Kanülen verstopfen würde. Ein Ausweichen auf größere Kanülen erfüllt nicht mehr den Anspruch einer minimalinvasiven Sepsisinduktion, sodass eine Bearbeitung des Stuhls notwendig ist. Hierzu wurde der Stuhl verdünnt und gefiltert.

Um auszuschließen, dass durch das Filtern die Gesamtmenge an Bakterien reduziert wird, wurden die Bakterienquantität und -qualität vor und nach der Bearbeitung verglichen.

Der frische Stuhl von 5 Mäusen wurde gepoolt. Eine Probe wurde entnommen und direkt ausgestrichen. Es folgte ein Ausstrich der 1:3 Verdünnung dieses Stuhls, diese Verdünnung wurde gefiltert und anschließend ebenfalls ausgestrichen. Die Ausstriche wurden für 48 Stunden bei 36 °C bebrütet. Im frischen Stuhl fand sich ein polymikrobielles Spektrum mit *E. coli*, der KEESC-Gruppe, *Proteus* und *S. saprophyticus*. Das polymikrobielle Spektrum war auch nach Verdünnung und Filterung noch erhalten. Wie Abbildung 13 zeigt, führten Verdünnung und Filterung des Stuhls zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zum frischen Stuhl.

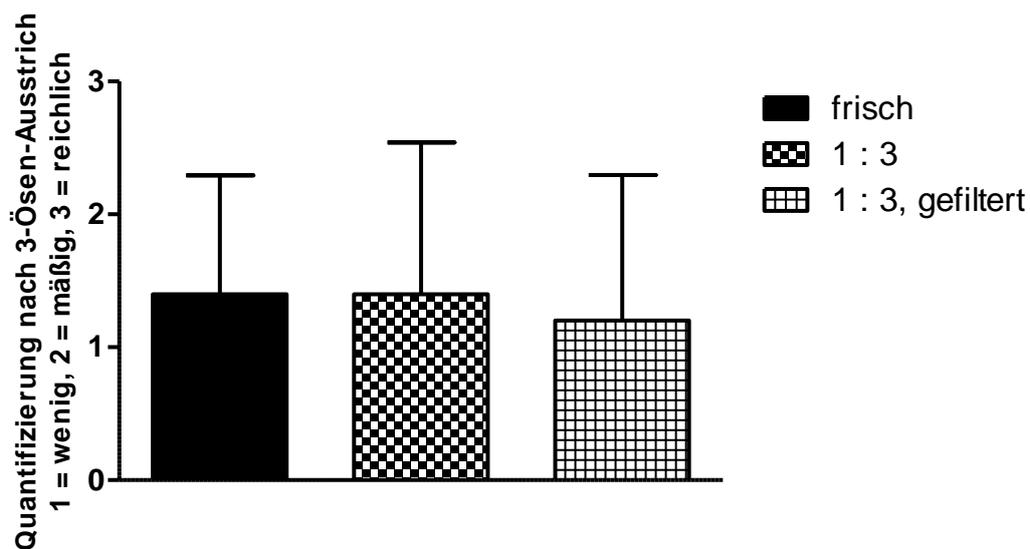


Abb. 13: Vergleich der dargestellten Bearbeitungsschritte des Stuhls: Der frische Stuhl von 5 Mäusen wurde gepoolt. Eine Probe wurde entnommen und direkt ausgestrichen. Es folgte ein Ausstrich der 1:3 Verdünnung dieses Stuhls und anschließend der Ausstrich der gefilterten 1:3 Verdünnung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. n=5, gepaarte t-Tests.

4.4 Peritoneallavage

Um zu ermitteln, ob es tatsächlich zu einer Infektion durch lebende Bakterien im Peritonealraum kommt, wurde 12 Stunden nach IPSI mit 1:3 verdünntem Stuhl eine Peritoneallavage bei 26 Mäusen durchgeführt. Die Ausstriche des injizierten Stuhls im

Vergleich zu den Ausstrichen der Peritoneallavages sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Bakterienquantität unterscheidet sich nicht signifikant. Da sich in der Peritoneallavage der Sham- und Kontrolltiere keine Bakterienkolonien zeigten, sind diese in der Abbildung nicht dargestellt.

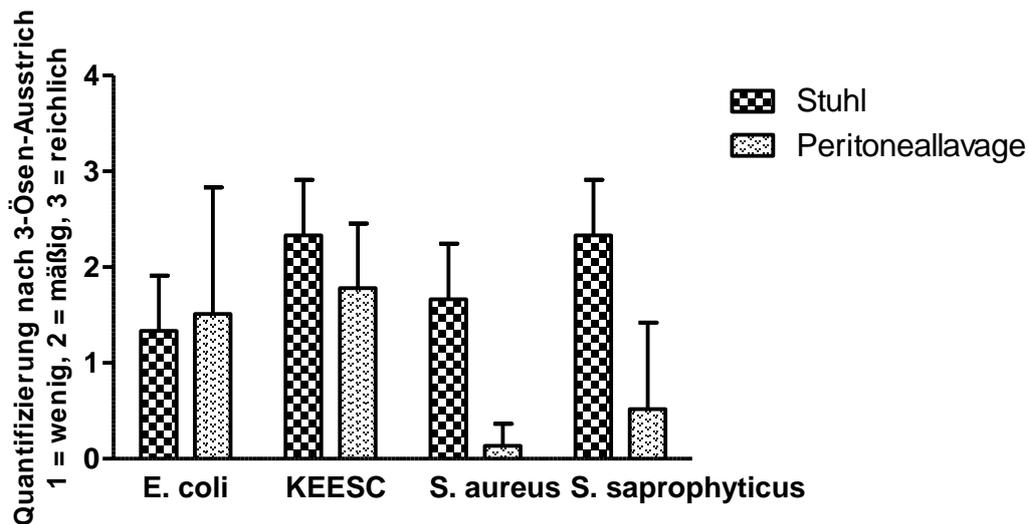


Abb. 14: Vergleich der zur IPSI verwendeten 1:3 Verdünnung mit der Peritoneallavage: Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden zusammengefasst. Der frische Stuhl von 60 Mäusen wurde gepoolt und 1:3 verdünnt. Eine Probe wurde entnommen und direkt ausgestrichen. Die anschließend gefilterte Stuhlverdünnung wurde zur IPSI verwendet. Nach Erfüllen der Abbruchkriterien erfolgte die Euthanasie der Mäuse. Bei 26 Mäusen wurde eine Peritoneallavage gewonnen und ausgestrichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Stuhl: n=60, Peritoneallavage: n=26, gepaarte t-Tests.

4.5 Einfluss der zirkadianen Rhythmik der Mäuse auf Gewicht und Temperatur

Mäuse unterliegen physiologisch einer zirkadianen Rhythmik. Sie sind in der Dunkelphase, also nachts, aktiv (Ebong et al. 1999; König 2012; Steinlechner 2012; Vandenbergh 2008). In unserem Tierhaus dauert die Dunkelphase des Tag-Nacht-Rhythmus von 19 bis 7 Uhr. Wir untersuchten die Unterschiede zwischen der Aktivitäts- und der Ruhephase, also zwischen Tag und Nacht. Bei jeweils 10 unbehandelten Mäusen erfolgten Gewichts- und Temperaturkontrollen im Abstand von 12 Stunden.

4.5.1 Gewichtsveränderung

Über Nacht konnten wir eine signifikante Gewichtszunahme der unbehandelten Mäuse (Abb. 15) messen. Abends lag das durchschnittliche Gewicht der Mäuse bei 22,61 g und am Morgen bei 23,99 g, somit nahmen die Mäuse durchschnittlich um 1,38 g zu.

Da die Nahrungsaufnahme nachts stattfand und die Mäuse tags schliefen, verloren sie tagsüber signifikant an Gewicht. Hier kam es zu einer Gewichtsreduktion von durchschnittlich 1,01 g (Abb. 16).

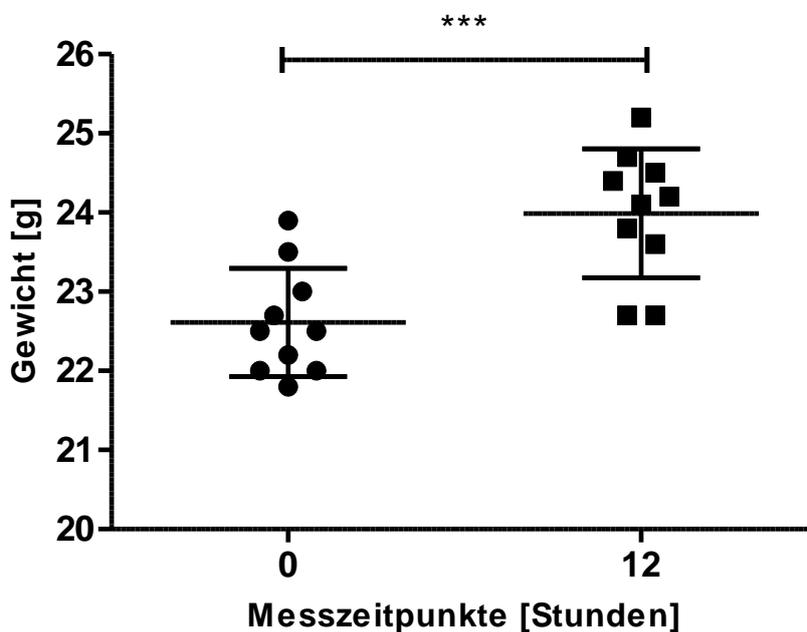


Abb. 15: Gewichtsveränderung von unbehandelten Mäusen über die Nacht: 10 unbehandelte Mäuse wurden abends und morgens (12 Stunden später) gewogen. *** $p < 0,001$. $n=10$, gepaarter t-Test.

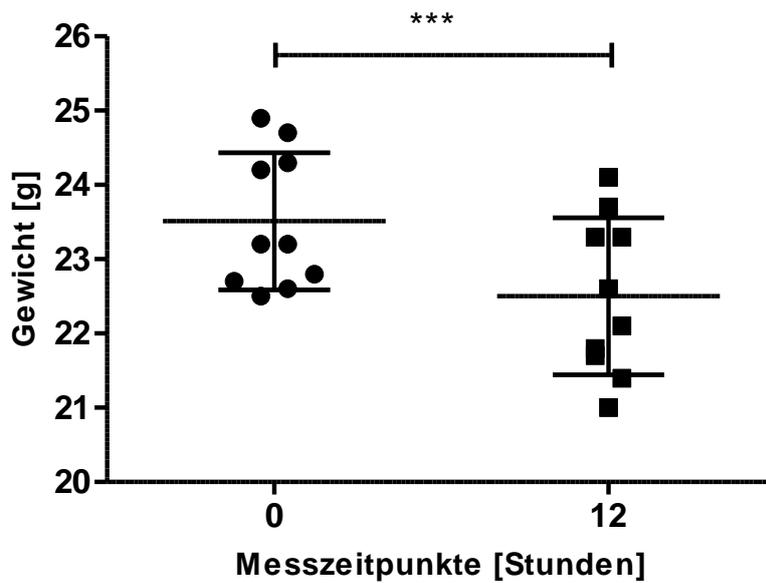


Abb. 16: Gewichtsveränderung von unbehandelten Mäusen über den Tag: 10 unbehandelte Mäuse wurden morgens und abends (12 Stunden später) gewogen. *** $p < 0,001$. $n=10$, gepaarter t-Test.

4.5.2 Temperaturveränderung

Auch in der Untersuchung der Temperatur der unbehandelten Mäuse im Tagesverlauf zeigten sich signifikante Unterschiede. Aktivität erhöht die Körpertemperatur und weil die Mäuse tags nicht aktiv waren, sank die Temperatur im Verlauf des Tages signifikant. Morgens lag die Durchschnittstemperatur bei 36,14 °C und abends bei 35,01 °C (Abb. 17).

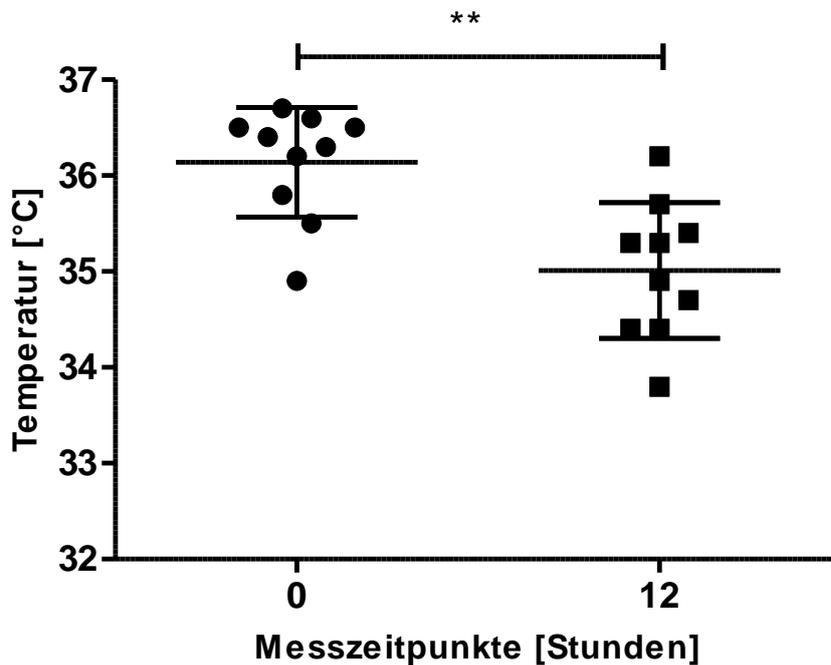


Abb. 17: Temperaturveränderung von unbehandelten Mäusen über den Tag: Die Temperatur von 10 unbehandelten Mäusen wurde morgens und abends (12 Stunden später) gemessen. ** $p < 0,01$. $n=10$, gepaarter t-Test.

Gewichts- und Temperaturverlauf im Rahmen der zirkadianen Rhythmik führen bereits bei unbehandelten Mäusen zu signifikanten Unterschieden. Diese sind in der Versuchsplanung dringend zu berücksichtigen. Sowohl die Injektion der Stuhlösung zur IPSI, sowie die Kontrollen, müssen immer zur selben Zeit vorgenommen werden, weil Ergebnisse sonst verfälscht werden. Dies wurde in unseren Versuchen stets eingehalten. Wir induzierten die Sepsis durch IPSI abends.

4.6 Modulierung des Krankheitsverlaufs durch IPSI mit verschiedenen Stuhlverdünnungen

Zur Erfassung des Krankheitsverlaufs nach IPSI im Mausmodell mit verschiedenen Stuhlverdünnungen, wurden die Parameter Gewicht, Temperatur und Krankheitsscore erhoben. Für diese Versuche wurde Stuhl gepoolt, gefiltert und jeweils in den Verdünnungen 1:3, 1:6 oder 1:9 injiziert. Um die Auswirkungen der Punktion an sich zu klassifizieren, erfolgte in der Sham-Gruppe die Injektion von steriler Kochsalzlösung. In

der Kontrollgruppe wurde kein Eingriff vorgenommen. Wie Shrum et al. (2014) konnten auch wir in Vorversuchen feststellen, dass sich deutliche Krankheitszeichen 8 - 12 Stunden nach IPSI zeigen. Hier sollte der erste Kontrollzeitpunkt gewählt werden. Gewicht, Temperatur und Krankheitsscore wurden vor und 12 Stunden nach IPSI erhoben. Sie sind in den Abbildungen 18 - 20 dargestellt. Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden zusammengefasst.

4.6.1 Gewichtsveränderung

Es kam zu einer signifikanten Gewichtsreduktion nach IPSI mit allen getesteten Stuhlverdünnungen (siehe Abb. 18). In der 1:3 Gruppe lag vor IPSI das durchschnittliche Gewicht der Mäuse bei 23,17 g. 12 Stunden nach IPSI kam es zu einer Reduktion des Gewichts um 3,29 %, auf einen Durchschnitt von 22,42 g. Auch in der 1:6 Gruppe konnten wir eine Gewichtsreduktion zeigen. Hier erhoben wir ein Ausgangsgewicht von 23,2 g und 12 Stunden nach IPSI mit einer Reduktion um 3,33 % einen Durchschnitt von 22,43 g. Nach IPSI mit der 1:9 Verdünnung sank das Gewicht der Mäuse von durchschnittlich 22,63 g auf 21,95 g und somit um 2,98 %.

In der Sham- und der Kontrollgruppe zeigte sich eine Gewichtszunahme der Mäuse über Nacht entsprechend unseren Ergebnissen in Abbildung 15 zu Gewichtsveränderungen un behandelter Mäuse. In der Sham-Gruppe nahmen die Mäuse über Nacht durchschnittlich um 1,16 g und somit 4,95 % zu. In der Kontrollgruppe kam es zu einer Gewichtszunahme um durchschnittlich 1,11 g und somit 4,71 %. Der Unterschied zwischen Mäusen, die die Stuhlinjektion erhielten und denen, die nur Kochsalzlösung bzw. keine Behandlung erhielten, wird hier besonders deutlich. Die Mäuse der IPSI Gruppen nahmen signifikant an Gewicht ab, wohingegen die Kontroll- und die Sham-Gruppe an Gewicht zunahmen.

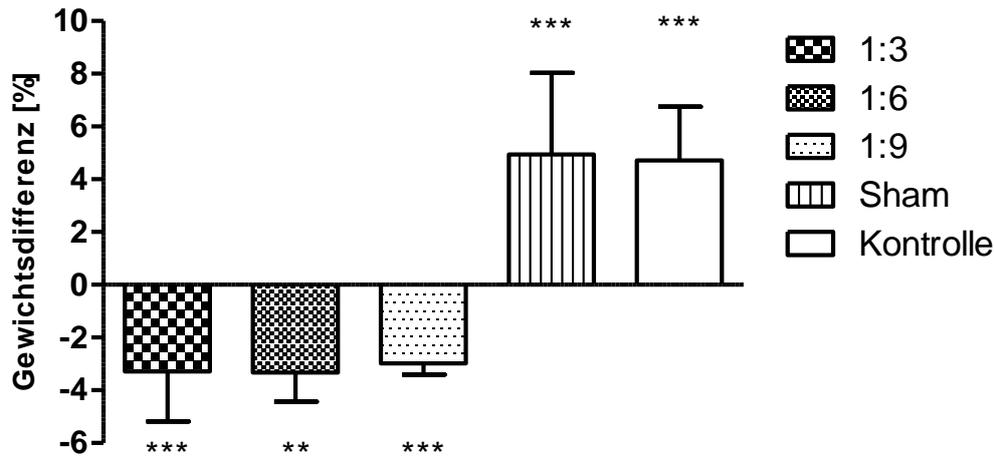


Abb. 18: Prozentuale Gewichtsveränderungen von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9: Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden zusammengefasst. Die Mäuse wurden vor und 12 Stunden nach IPSI gewogen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 1:3 $n=23$; 1:6 und 1:9. $n=4$, Sham und Kontrolle $n=22$, gepaarte t-Tests.

4.6.2 Temperaturveränderung

Nach IPSI mit den Verdünnungen 1:3 und 1:6 kam es zu einem signifikanten Temperaturverlust (Abb. 19). Vor IPSI lag die Temperatur der 1:3 Gruppe durchschnittlich bei 36,01 °C und der 1:6 Gruppe bei 35,65 °C. In der 1:3 Gruppe verringerte sich die Temperatur 12 Stunden nach IPSI um 9,87 °C im Durchschnitt, also um 27,14 %. In der 1:6 Gruppe war der Temperaturverlust mit 1,65 °C und somit 4,61 % deutlich geringer. In der 1:9 Gruppe zeigte sich zwischen durchschnittlich 34,3 °C vor IPSI und 34,18 °C nach IPSI kein signifikanter Unterschied.

In der Sham- und der Kontrollgruppe, veränderte sich die Temperatur der Mäuse nicht signifikant und lag sowohl bei der ersten, als auch der zweiten Messung bei etwa 36 °C.

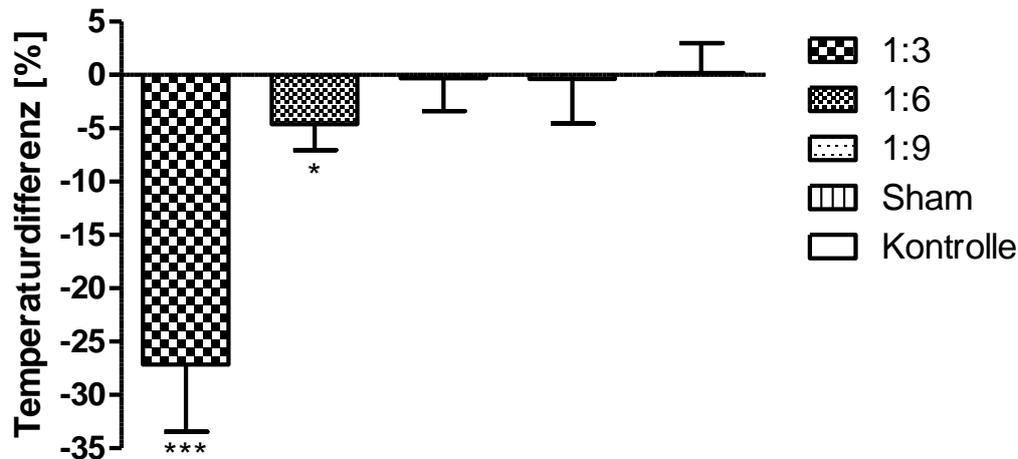


Abb. 19: Prozentuale Temperaturveränderungen von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9: Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden zusammengefasst. Die Temperatur der Mäuse wurde vor und 12 Stunden nach IPSI gemessen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; 1:3 $n=23$; 1:6 und 1:9. $n=4$, gepaarte t-Tests.

4.6.3 Krankheitsscore

Um die Krankheitsschwere zu ermitteln und zu vergleichen, erhoben wir den klinischen Krankheitsscore (detaillierte Beschreibung im Methodenteil) der Mäuse nach IPSI (Abb. 20).

Nach Injektion des 1:3 verdünnten Stuhls bewerteten wir die Mäuse mit dem höchsten Krankheitsscore. Hier waren klinische Krankheitssymptome wie struppiges Fell, verklebte Körperöffnungen und Einschränkungen in der Motorik sehr deutlich ausgeprägt. In der 1:3 Gruppe lag der Krankheitsscore durchschnittlich bei 6,7 und somit signifikant höher als nach IPSI mit der 1:6 und 1:9 Verdünnung. Der Mittelwert nach Injektion der 1:6 Verdünnung lag nur bei 1,75, da die Mäuse deutlich weniger klinische Krankheitszeichen zeigten. Der geringste Krankheitsscore zeigte sich nach IPSI mit der 1:9 Verdünnung mit einem Mittelwert von 0,25. Diese Gruppe zeigte nur eine geringe Ausprägung der Symptome bzw. teilweise auch gar keine. Der Unterschied zwischen der 1:6 und der 1:9 Gruppe war nicht signifikant. Die Mäuse der Sham- und die der Kontrollgruppe zeigten keine Krankheitszeichen und wurden mit einem Krankheitsscore von 0 bewertet (hier nicht dargestellt).

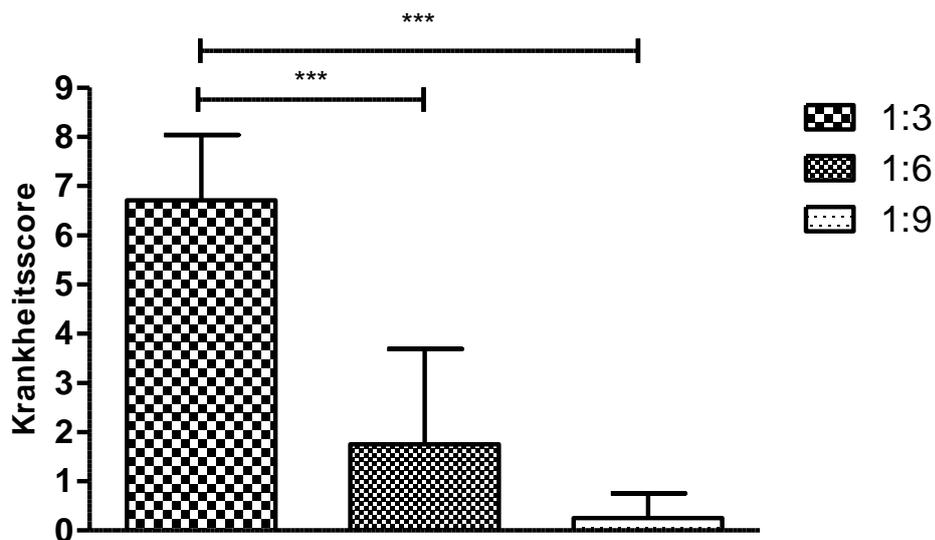


Abb. 20: Krankheitsscore von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9: Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden zusammengefasst. *** $p < 0,001$. 1:3 $n=24$, 1:6 und 1:9 $n=4$, ungepaarte t-Tests.

Wir konnten zeigen, dass sich der Krankheitsverlauf von Mäusen nach IPSI durch Veränderung der Stuhlverdünnung modulieren lässt. In unterschiedlichen Stuhlverdünnungen unterscheiden sich die von uns erhobenen Kriterien signifikant. Sowohl an objektiven Parametern wie Gewichts- und Temperaturveränderungen, als auch in Form des klinischen Krankheitsscores lassen sich die unterschiedlichen Krankheitsverläufe bzw. die unterschiedliche Krankheitschwere dokumentieren.

4.7 Überlebenskinetik und Krankheitsscore im längeren Krankheitsverlauf

In diesem Versuch wurden der längere Krankheitsverlauf, anhand des Krankheitsscores, sowie der Überlebenszeit bis 48 Stunden nach IPSI beobachtet. Die IPSI erfolgte bei jeweils zehn Mäusen mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9. Mäuse, die vor Ablauf des 48-stündigen Beobachtungsintervalls die Abbruchkriterien erreicht hatten (siehe Methodenteil), wurden euthanasiert. Nach 48 Stunden wurde der Versuch beendet und das Überleben der Tiere wurde in einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt.

In der Gruppe der Mäuse, denen eine 1:3 Verdünnung des Stuhls injiziert wurde, lag die Überlebenszeit im Durchschnitt bei 18,7 Stunden. Es zeigte sich eine Mortalität von 100 % innerhalb von 24 Stunden. Hier traten signifikante Unterschiede zu allen anderen dargestellten Gruppen auf (Abb. 21). In der Gruppe, der eine 1:6 Verdünnung des Stuhls injiziert wurde, verstarben in den ersten 24 Stunden nur zwei von zehn Mäusen. Zwischen 24 und 28 Stunden nach IPSI verstarben in dieser Gruppe 9 Tiere, so dass den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nur eine Maus der 1:6 Gruppe überlebte. Die durchschnittliche Überlebenszeit der 1:6-Gruppe lag bei 28,2 Stunden. Ein signifikanter Unterschied lag im Vergleich zur 1:3, sowie der Sham-Gruppe vor. Bei Injektion von 1:9 verdünntem Stuhl überlebten 60 % der zehn Mäuse den Beobachtungszeitraum von 48 Stunden. Alle Sham-Mäuse überlebten ebenfalls.

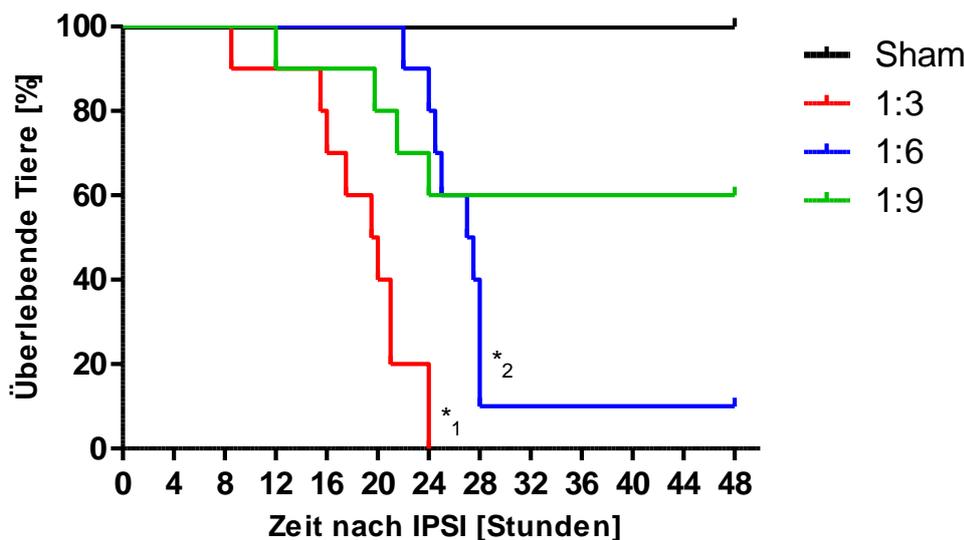


Abb. 21: Darstellung des Überlebens von Mäusen nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9 im Verlauf von 48 Stunden: n=10, Sham n=5, ungepaarte t-Tests. *₁: Kurve signifikant unterschiedlich im Vergleich zu allen anderen, *₂: Kurve signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Sham und 1:3.

Auch im Krankheitsscore fanden sich signifikante Unterschiede (siehe Abb. 22). Bei der 1:3 Verdünnung lag zu jedem Kontrollzeitpunkt ein signifikant höherer Krankheitsscore als bei 1:6 und 1:9 vor. Wie in Abbildung 21 dargestellt, verstarben diese Mäuse früh. Tote Tiere wurden mit dem Maximalscore von 9 berücksichtigt. 24 Stunden nach IPSI waren alle Mäuse der 1:3 Gruppe bereits verstorben und wurden mit einem

Krankheitsscore von 9 erfasst, sodass keine Standardabweichung dargestellt werden kann. Der Krankheitsscore nach Injektion der 1:6 Verdünnung war signifikant geringer als nach Injektion der 1:3 Verdünnung. Den niedrigsten Krankheitsscore und somit die geringste Symptomatik zeigten Tiere, denen die 1:9 Verdünnung injiziert wurde. Da die Sham-Gruppe keine Krankheitszeichen und somit einen Krankheitsscore von null zeigte, ist sie in Abbildung 22 nicht dargestellt.

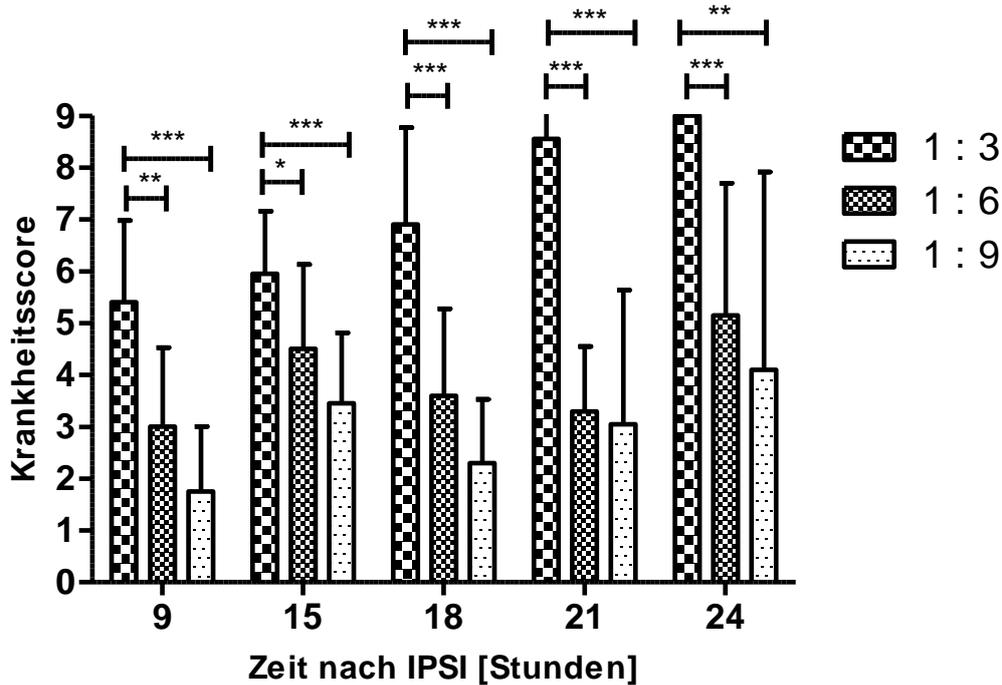


Abb. 22: Darstellung des Verlaufs des Krankheitsscores von Mäusen nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9; n=10, ungepaarte t-Tests. Verstorbene Tiere erhielten den maximalen Krankheitsscore von 9 und wurden weiterhin berücksichtigt.

5. Diskussion

5.1 Das optimale Tiermodell

Da in dieser Arbeit ein neues Modell zur Sepsisinduktion etabliert und untersucht wurde, soll dieses nun in Hinsicht auf seine Eignung, sowie im Vergleich mit den gängigsten Sepsismodellen diskutiert werden. Hier sind zunächst die Anforderungen an ein optimales Modell zu definieren.

5.1.1 Klinik

Das wichtigste Kriterium für ein gutes Tiermodell ist, dass es die zu untersuchende Krankheit widerspiegelt (Maier et al. 2004). In unserem Modell soll eine abdominelle Sepsis erzeugt werden. Es soll zu einer Infektion durch Bakterien aus intraabdominellen Organen kommen. Im Idealfall entspricht das Bakterienspektrum dem des darzustellenden Infektfokus. Da die abdominelle Sepsis in der Regel polymikrobiell ist (Gonnert et al. 2011), soll dies auch für die Sepsisinduktion in einem solchen Modell gelten. Deswegen wurde das Stuhlgemisch zur Injektion von uns auf sein Bakterienspektrum untersucht.

Buras et al. (2005) beschreiben, dass die Sepsis des Menschen in der Regel im Verlauf von Tagen bis Wochen entsteht und nicht, wie im Tiermodell häufig, über Stunden. Auch Wichterman et al. (1980) empfehlen, dass der septische Insult einen gewissen Zeitraum anhält, sodass es zu einer Wirtsantwort und einer Auseinandersetzung mit der Infektion kommen kann. Ein Modell, das einen längeren Verlauf darstellen kann, wäre dementsprechend wünschenswert. So untersuchten wir die Möglichkeiten im IPSI-Modell einen längeren und subletalen Verlauf zu simulieren.

Ein optimales Tiermodell sollte den klinischen Symptomen der zu untersuchenden Krankheit möglichst nah kommen (Buras et al. 2005; Deitch 2005; Maier et al. 2004; Tracey und Abraham 1999; Wichterman et al. 1980). Wichterman et al. (1980) nennen als klinische Parameter, die im Tiermodell erfasst werden können, Hypo- oder Hyperthermie, Schwäche und Unwohlsein, sowie die Änderung des normalen

Verhaltens der Tiere. Entsprechend der neuen Definition (Sepsis-3) von Singer et al. (2016) handelt es sich bei einer Sepsis um eine lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine fehlregulierte Wirtsantwort. Wie in der Einleitung beschrieben, wird die Organdysfunktion beim Menschen mit dem SOFA-Score klassifiziert und so die Diagnose einer Sepsis gestellt. Die hier betrachteten Parameter wie Thrombozyten, Bilirubin, Kreatinin im Blut, sowie der MAD können auch im Tierversuch bestimmt werden und zur Diagnostik dienen. Wichterman et al. (1980) fordern positive Blutkulturen mit den Bakterien, die auch im Infektionsherd zu finden sind. Um im SOFA-Score eine Dysfunktion des ZNS einzuschätzen, wird beim Menschen die Glasgow Coma Scale ermittelt. Auch im Tierversuch können Scores, wie z.B. unser Krankheitsscore verwendet werden, um Dysfunktionen zu bewerten und die Klinik und Krankheitsschwere zu klassifizieren.

5.1.2 Induktion

Die Sepsisinduktion an sich sollte eine möglichst geringe Komplikationsrate haben. Je invasiver die Induktion, desto mehr Komplikationen sind möglich. Ist eine Narkose notwendig, sind Narkoserisiken zu beachten. Ein Einfluss der Narkotika auf die Hämodynamik ist beim Menschen bekannt und findet sich dementsprechend auch bei der Maus. Verschiedene Narkoseformen und Narkosemedikamente haben zudem unterschiedlich großen Einfluss auf die Hämodynamik (Tao et al. 2004). Dies ist beim Vergleich von Studien zu beachten. Auch ein Einfluss der Narkose auf die Genexpression wurde beschrieben (Hamaya et al. 2000). Im Idealfall ist die Sepsisinduktion ohne Narkose möglich (Parker und Watkins 2001). Wird die Sepsis in Form einer Operation induziert, kann die Operation an sich schon zu einer hohen Mortalität führen. Lee et al. (2003) zeigten signifikante Änderungen der Zytokinausschüttung von Makrophagen nach einer Laparotomie, welche Ergebnisse verändern können. Auf Narkose und Operation folgt häufig eine Hypothermie (Belikoff und Buras 2008; Leon et al. 1998), welche durch perioperatives Wärmen gemindert werden muss. Diese kann den Krankheitsverlauf beeinflussen. Außerdem kommt es durch die Operation zu einem Flüssigkeitsverlust, welcher ausgeglichen werden muss.

Im Idealfall ist die Sepsisinduktion an sich mit wenigen Komplikationen verbunden. Ein minimalinvasives Verfahren ohne Operation und Narkose gewährleistet dies. Ein minimalinvasives Verfahren ist zusätzlich unkomplizierter in der Durchführung und somit besser reproduzierbar. Um den Einfluss der intraperitonealen Injektion an sich zu untersuchen, verglichen wir nicht nur die Stuhlinjektion in verschiedener Konzentration, sondern auch die Sham-Gruppe, der nur sterile Kochsalzlösung injiziert wurde, mit der Kontrollgruppe.

5.1.3 Modulierbarkeit

Ein optimales Sepsismodell soll Modulierbarkeit bieten. Es soll eine unterschiedliche Krankheitsschwere mit unterschiedlichem Verlauf erzeugt werden können. Besonders ein längerer Verlauf einer Sepsis ist wichtig, sodass die Zytokinausschüttung im Verlauf und ggf. auch Therapiemöglichkeiten untersucht werden können.

5.1.4 Reproduzierbarkeit

Das optimale Tiermodell sollte reproduzierbar sein (Parker und Watkins 2001; Wichterman et al. 1980). Dies beinhaltet auch eine vorhersagbare und konstante Mortalitätsrate (Deitch 2005). Wichterman et al. (1980) betonen, dass es von Vorteil ist, Variablen in Sepsismodellen gering zu halten, um eine gute Reproduzierbarkeit zu erzielen. Dies erreicht man mit einem Modell, welches einfach zu erlernen ist (Deitch 2005). Es sollen keine interindividuellen Unterschiede je nach durchführenden Personen entstehen. Hier ist ein minimalinvasives Modell ebenfalls von Vorteil.

Das Modell soll standardisiert sein. Eine gewünschte Krankheitsschwere soll jederzeit, auch in verschiedenen Laboren erzeugt werden können (Deitch 2005). Hier sind standardisierte Versuchsbedingungen notwendig, Wichterman et al. (1980) raten auch zu standardisierten Blutzucker-, Laktat- und Insulinwerten. Deitch (2005) empfehlen zusätzlich ein ökonomisches Modell. Kleine Tiere erzeugen zum Beispiel weniger Laborkosten als große.

5.2 IPSI als Sepsismodell

5.2.1 Klinik

12 Stunden nach der intraperitonealen Injektion unseres Stuhlgemischs entnahmen wir eine Peritoneallavage, um zu untersuchen, ob lebende Bakterien und somit eine intraabdominelle Infektion vorliegen. Wie Maier et al. (2004) beschreiben, spielt es prognostisch eine große Rolle, wie sehr sich die Bakterien in der Peritonealhöhle ausbreiten. Wir konnten in der Peritoneallavage ein polymikrobielles Bakterienspektrum nachweisen, das in seiner Gesamtzusammensetzung der des injizierten Stuhls entsprach. Es kommt somit tatsächlich zu einer Infektion mit lebenden Bakterien. Da sich bei der Sham- und der Kontroll-Gruppe keine Bakterienkolonien in der Peritoneallavage zeigten, wird deutlich, dass die Peritonitis durch die IPSI verursacht wurde. Unsere Ergebnisse bestätigen die von Lang et al. (1983) sowie Shrum et al. (2014). Das Kriterium eines polymikrobiellen Bakterienspektrums ist somit erfüllt.

Wir beobachteten die Mäuse nach IPSI maximal 48 Stunden. Hier lag die Mortalität der 1:3 Gruppe bei 100 % und die der 1:6 Gruppe bei 90 %. Hier ist also kein längerer Verlauf der Krankheit zu beobachten. In der 1:9 Gruppe lag die Mortalität nur bei 40 %. Hier wäre eine längere Beobachtung möglich. Es muss untersucht werden, wie sich die Mortalität nach Injektion anderer Stuhlverdünnungen wie 1:7 oder 1:8 verhält und wie die Überlebenskinetik hier aussähe.

Wir bewerteten die Klinik nach Sepsisinduktion durch IPSI anhand der Parameter Gewichts- und Temperaturveränderungen sowie durch unseren Krankheitsscore.

In unseren Versuchen konnten wir einen signifikanten Gewichtsverlust nach IPSI mit allen getesteten Stuhlverdünnungen feststellen (Abb. 18). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe, welche an Gewicht zunahm, wird das Ausmaß des Gewichtsverlusts der erkrankten Mäuse deutlich. Da es sich um eine Beobachtung der Tiere über Nacht handelte, ist die Gewichtszunahme der Kontrollgruppe mit der physiologischen Aktivität und Nahrungsaufnahme der Mäuse zu erklären.

Nach IPSI mit den Verdünnungen 1:3 und 1:6 kam es zu einer signifikanten Temperatursenkung (siehe Abb. 19), wobei die Differenz zum Ausgangswert in der 1:3

Gruppe besonders deutlich ausgeprägt war. Dies spricht für eine besonders schwere Erkrankung, wie auch im Krankheitsscore deutlich wurde. Nach IPSI mit einer 1:9 Stuhlverdünnung konnten wir keinen signifikanten Temperaturunterschied darstellen. Dies ist als geringere Ausprägung einer Infektion zu werten, was durch den geringen Krankheitsscore bestätigt wurde. Die Hypothermie korreliert also mit der Krankheitsschwere, wie in den Untersuchungen von Nemzek et al. (2004). Diese erklärten eine Hypothermie unter 30 °C als Prädiktor für den Tod einer Maus. Im Gegensatz zur Temperaturreduktion konnte im Gewichtsverlust nach IPSI kein Unterschied zwischen den verschiedenen Verdünnungen festgestellt werden. Wir konnten also keine Korrelation zwischen Gewichtsverlust und Krankheitsschwere feststellen.

Temperatur- und Gewichtsverlust sind sepsis-assoziierte Symptome und konnten nach IPSI nachgewiesen werden. Mit Hilfe unseres Krankheitsscores konnten wir klinische Symptome einer Sepsis diagnostizieren und quantifizieren.

5.2.2 Induktion

Die Mäuse der Sham-Gruppe unserer Versuche zeigten, wie die Kontrollgruppe, keine Krankheitszeichen und erhielten einen Krankheitsscore von 0. In der Sham-Gruppe kam es zu der gleichen Gewichtszunahme über Nacht wie in der Kontrollgruppe. Die Temperatur der Sham- und Kontrollgruppe veränderte sich nicht signifikant. Die intraperitoneale Injektion an sich führt also zu einer sehr geringen Beeinträchtigung der Mäuse. Bei der IPSI handelt es sich um ein minimalinvasives Sepsismodell, womit ein wichtiges Kriterium für ein gutes Modell erfüllt wird.

5.2.3 Modulierbarkeit

Wir induzierten die Sepsis mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9, um verschiedene Krankheitsgrade zu erzeugen. Die Bewertung der Krankheitsschwere erfolgte in Form des Krankheitsscores und der Überlebenszeit.

Wir zeigten, dass sich die Überlebenszeit mit Wahl der Stuhlverdünnung variieren lässt und somit ein letaler sowie ein subletaler Krankheitsverlauf erzeugt werden kann. Nach Injektion der 1:3 Verdünnung kam es zu einer Letalität von 100 %. Einen subletalen Krankheitsverlauf konnten wir mit der 1:9 Verdünnung mit einem Überleben von 60 % über 48 Stunden herbeiführen. Sowohl Shrum et al. (2014), als auch Wynn et al. (2007) zeigten die Korrelation zwischen Stuhlverdünnung und Mortalität bei intraperitonealer Stuhlinjektion, welche auch wir darstellen konnten.

Bei IPSI mit 1:3 verdünntem Stuhl wurde ein signifikant höherer Krankheitsscore erreicht als bei IPSI mit der 1:6 Verdünnung. Der geringste Krankheitsscore zeigte sich bei IPSI mit der 1:9 Verdünnung. Auch bei der Darstellung des Krankheitsscores im Zeitverlauf nach IPSI fanden sich signifikante Unterschiede je nach injizierter Stuhlverdünnung (siehe Abb. 22). Wie bei Gonnert et al. (2011), sowie Shrum et al. (2014) zeigte sich eine Korrelation des Krankheitsscores mit der injizierten Stuhlverdünnung. Bei der 1:3 Verdünnung lag zu jedem Kontrollzeitpunkt der höchste Krankheitsscore vor. Wie in Abbildung 21 dargestellt, verstarben diese Mäuse früh. Der Krankheitsscore nach Injektion der 1:6 Verdünnung war signifikant geringer als nach Injektion der 1:3 Verdünnung. Den niedrigste Krankheitsscore und somit die geringste Symptomatik zeigten Tiere, denen die 1:9 Verdünnungen injiziert wurde.

Das IPSI-Modell ist ein gut modulierbares Sepsismodell. Krankheitsschwere und Überlebenszeit sind durch die Wahl der injizierten Stuhlverdünnung variabel. Eine weitere Möglichkeit, die Krankheitsschwere zu modulieren, kann die mehrfache i.p. Injektion der Stuhllösung sein.

5.2.4 Reproduzierbarkeit

Da unser IPSI-Modell unkompliziert in der Durchführung ist, ist es leicht zu erlernen und führt zu guten Voraussetzungen für eine gute Reproduzierbarkeit. In unseren Versuchen konnten wir die unterschiedlichen Krankheitsgrade mit verschiedener Stuhlverdünnung reproduzieren.

5.3 Methodik

5.3.1 Stuhllagerung

Der zur IPSI verwendete Stuhl sollte immer gleich zusammengesetzt sein. Im Idealfall sollte für jede Versuchsreihe derselbe Stuhl verwendet werden. So kann prinzipiell eine sehr große Stuhlmenge im Vorfeld entnommen und bis zur Verwendung gelagert werden. Wir untersuchten den Einfluss der Lagerung auf die Stuhlzusammensetzung, um eine Vorgehensweise zu finden, die die Originalzusammensetzung des murinen Stuhls möglichst wenig verändert.

In der Literatur finden sich vielversprechende Ergebnisse zum Überleben von Bakterien nach Einfrieren. Dan et al. (1989) konnten zeigen, dass Bakterien eine 12-monatige Lagerung bei -70 °C grundsätzlich überleben. Sie verglichen Stuhlzusammensetzung und Bakterienquantität allerdings nicht mit der des frischen Stuhls. Gonnert et al. (2011) fügten gepoolten Stuhlproben von Menschen unter anderem Thioglycolat, Bariumsulfat und Glycerin zu und fanden bei einer Lagerung bei -80 °C erst nach 3 Jahren weniger Bakterienkolonien (CFUs) im Stuhl. Eine Veränderung der Überlebenszeit der Tiere nach Injektion dieses Stuhls zeigte sich nicht. In Untersuchungen von Saraka et al. (2015) überlebten Bakterien die Lagerung bei -80 °C mit Glycerinzugabe ebenfalls. Lang et al. (1983) fügten ihren bei -60 °C gelagerten Stuhlproben nach dem Auftauen Bariumsulfat zu. Auch sie fanden keine Veränderung der Stuhlzusammensetzung.

Wir untersuchten den Einfluss der Lagerung bei -20 °C auf die Stuhlzusammensetzung. Die Zahl der *S. saprophyticus*-Kolonien verringerte sich signifikant und es blieben keine *E. coli* Stämme erhalten. Die Quantität der restlichen Bakterienstämme war nicht signifikant verändert. Hier zeigte sich, dass verschiedene Bakterienstämme unterschiedlich empfindlich auf die Lagerungstemperatur reagieren. Dan et al. (1989) konnten solche Unterschiede auch für die Lagerung bei 4 °C zeigen. Saraka et al. (2015) weisen ebenfalls auf mögliche Unterschiede in der Sensibilität auf Einfrieren sowie Auftauen verschiedener Bakterienstämme hin. Ohne Zugabe von Glycerin starben die Bakterien sehr schnell, unter Zugabe von Glycerin zeigten sie einen starken Rückgang der CFUs.

Unter Zugabe von stabilisierenden Faktoren können Bakterien im Stuhl grundsätzlich auch nach Einfrieren erhalten bleiben. Die Zusätze, die zur Erhaltung der Bakterien notwendig sind, müssten im IPSI-Modell mitinjiziert werden. Hier kann es zu Reaktionen kommen, die Ergebnisse beeinflussen können. Interessant ist, dass Weinstein et al. (1974) den Stuhlgemischen, die sie injizierten, gezielt Bariumsulfat hinzufügten, um die Toxizität zu steigern, da es bekannt für seine reizende Wirkung ist. Wir verzichteten daher ganz gezielt auf Zusätze, die eine längere Haltbarkeit des Stuhls gewährleisten können. Die Zusammensetzung in eingefrorenem Stuhl ohne stabilisierende Zusätze entspricht nicht verlässlich der des frischen Stuhls, deswegen verzichteten wir auf das Einfrieren des Stuhls.

Bei Lagerung des Stuhls bei 4 - 6 °C über 96 Stunden kam es in unseren Untersuchungen zu keiner signifikanten Änderung der Stuhlzusammensetzung. Wir bestätigten somit die Ergebnisse verschiedener Autoren, wie Dan et al. (1989) und Saraka et al. (2015) die dies übereinstimmend zeigen konnten.

Bei der Stuhllagerung bei 4 - 6 °C für einen Zeitraum unter einer Woche sind grundsätzlich keine signifikanten Änderungen der Stuhlzusammensetzung zu erwarten, deswegen entschieden wir uns für diese Lagerungsmethode. Da wir den auf CHROMagar™ MH Orientation-Platten ausgestrichenen Stuhl für 48 Stunden bebrüteten, ist es in unserem Modell möglich, die Stuhlzusammensetzung vor Injektion zu untersuchen. Dies ist ein großer Unterschied im Vergleich zum CLP- und CASP-Modell, in denen das Bakterienspektrum, mit dem die Infektion stattfindet, nie vorher bekannt ist. Um dem Anspruch einer möglichst physiologischen Stuhlzusammensetzung für die IPSI gerecht zu werden, hielten wir die Lagerung jedoch insgesamt so kurz wie möglich. Wir lagerten den Stuhl maximal acht Stunden. Insgesamt konnten wir zeigen, dass ein Stuhlgemisch, welches für 96 Stunden bei 4 - 6 °C gelagert wurde, zur Sepsisinduktion durch IPSI geeignet ist. Für eine längere Versuchsreihe über mehrere Wochen müssen für unser IPSI-Modell jedoch erneute Stuhlentnahmen erfolgen.

5.3.2 Stuhlbearbeitung

In Modellen der intraperitonealen Stuhlinjektion muss der Stuhl zur Injektion bearbeitet werden. Dies gilt sowohl für Modelle in denen Stuhl aus dem Käfig der Tiere gesammelt wird (Lang et al. 1983), Modelle mit Stuhl von menschlichen Spendern (Gonnert et al.

2011), als auch für solche, in denen noch flüssiger Stuhl direkt aus dem Darm entnommen wird, wie in unserem IPSI-Modell oder in den Modellen von Brealey et al. (2004) oder Shrum et al. (2014). Zu der Bearbeitung gehören das Poolen, Filtern und Verdünnen der Stuhlproben.

Wir konnten erhebliche interindividuelle Unterschiede in der Stuhlzusammensetzung, insbesondere im Vorkommen von *E. coli* und *S. aureus* darstellen. Daher sollte der Stuhl der Stuhldonoren gepoolt werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass eine identische Bakterienzusammensetzung für eine Versuchsreihe vorliegt. Lang et al. (1983) vermischten die Stuhlpellets von über 100 Ratten, um eine standardisierte und reproduzierbare Stuhlzusammensetzung zu gewährleisten. Diese beinhaltete vergleichbar mit dem gepoolten Stuhl in unseren Versuchen *Lactobacillus*, *Enterokokken*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* (Lang et al. 1983). Auch Shrum et al. (2014) vermischten den Stuhl mehrerer Mäuse. Mit unseren Ergebnissen konnten wir ebenfalls die von Lohner et al. (2013) bezüglich der Stuhlzusammensetzung bei BL/6 Mäusen bestätigen: *Enterobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Lactobacillus*. Da durch Luftkontakt Anaerobier absterben können, entspricht der Stuhl in seiner Quantität nicht exakt der des frischen Stuhls. Fuchs (2010) untersuchte die physiologische Darmflora in BL/6 Mäusen und fand *E. coli*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillen*, *Enterococcus*, aber auch Anaerobier, wie zum Beispiel *Clostridium* und *Eubacterium*. Das Keimspektrum an Aerobiern konnten auch wir auf CHROMagar™ MH Orientation nachweisen. Anaerobier konnten wir, wie auch Gonnert et al. (2011), sowie Shrum et al. (2014) nicht nachweisen. Gonnert et al. (2011) bezeichnen dies als vertretbar, da die für die intraperitoneale Sepsis besonders relevanten Bakterien wie *E. coli* und *Bacteroides* vorhanden bleiben.

Damit der Stuhl minimalinvasiv injiziert werden kann, wurde er in unseren Versuchen, ähnlich wie auch in Versuchen von Brealey et al. (2004), gefiltert. Shrum et al. (2014) entfernten feste Bestandteile des Stuhls, indem sie die Lösung durch ein Nylon-Netz pressten, wodurch ein ähnlicher Effekt entsteht. Anschließend erfolgt die Verdünnung. Im Drei-Ösen-Ausstrich nach Filterung bzw. Verdünnung kam es zu keiner signifikanten

Veränderung der Stuhlzusammensetzung. Durch die Bearbeitung wurden die Bakterienstämme also nicht zerstört.

Durch das Poolen des Stuhls wird eine hohe Standardisierung der Versuchsbedingungen erreicht, weil alle Mäuse in einem Versuch denselben Stuhl erhalten. Allerdings muss durch die oben beschriebene zeitliche Einschränkung der Stuhllagerung für die nächste Versuchsreihe neuer Stuhl entnommen und gepoolt werden. Trotz einer Vermischung der Stuhlproben kommt es aufgrund der interindividuellen Unterschiede in jeder Versuchsreihe möglicherweise zu einer Konfrontation mit einem unterschiedlichen Bakterienaufkommen. Hierin kann ein Nachteil unseres IPSI-Modells im Vergleich zu Modellen wie CLP und CASP, in denen die Stuhllagerung entfällt, bestehen. Da wir in unterschiedlichen Versuchsreihen mit jeweils neu erstellten Stuhlgemischen reproduzierbare Ergebnisse erzielen konnten, ist dies möglicherweise vernachlässigbar.

Wir können davon ausgehen, dass unser gepoolter, gefilterter und verdünnter Stuhl physiologisch und repräsentativ und somit sehr gut zur IPSI geeignet ist.

5.3.3 Klinische Parameter: Gewicht und Temperatur

In einem guten Sepsismodell soll die Klinik der Sepsis dargestellt werden (Buras et al. 2005; Deitch 2005; Wichterman et al. 1980). Verschiedene Schweregrade sind wünschenswert. Es gibt vielfältige Möglichkeiten die Klinik und die Krankheitsschwere zu bewerten. Grundsätzlich kommt die Erhebung von invasiven sowie nichtinvasiven Parametern zur Einschätzung der Krankheitsschwere in Frage. Zu den invasiven Parametern gehören zum Beispiel die Überwachung von Kreislaufparametern mittels eines Katheters im linken Ventrikel, wie sie z.B. von Tao et al. (2004) bei Untersuchungen am CLP-Modell durchgeführt wurden, sowie Blutuntersuchungen. Auch Temperatur und Aktivität können invasiv gemessen werden (Ebong et al. 1999). Der Vorteil invasiver Messungen ist die Objektivität der erhobenen Werte. Nachteile sind die Eingriffe, die notwendig sind, um Katheter oder Transponder einzusetzen. Im Rahmen der Eingriffe kann es durchaus zu Komplikationen kommen, durch die ein Ausschluss des Tieres aus dem Versuch notwendig wird. Die zusätzlich notwendige Narkose birgt

das Risiko, Ergebnisse zu verändern. Wichterman et al. (1980) beschreiben auch, dass invasive Parameter bei größeren Tieren erheblich einfacher zu bestimmen sind als bei kleinen Tieren wie Mäusen oder Ratten.

Zu den nichtinvasiven Parametern gehören das Körpergewicht und die Körpertemperatur, sowie unser Krankheitsscore. In Vorversuchen untersuchten wir die physiologischen Veränderungen von Gewicht und Temperatur im Hinblick auf die zirkadiane Rhythmik bei Mäusen. Wir konnten über Nacht eine signifikante Gewichtszunahme der Mäuse feststellen. Tagsüber verloren sie signifikant an Gewicht. Außerdem stieg die Körpertemperatur über Nacht und nahm tagsüber wieder ab. Diese Beobachtungen sind auf die Nachtaktivität zurückzuführen. Nahrungs- und Wasseraufnahme finden in der Aktivitätsphase, dementsprechend bei Mäusen nachts statt, wodurch es zu einer Gewichtszunahme kommt (Steinlechner 2012). Während der Aktivitätsphase der Tiere steigt auch die Temperatur. Kozak et al. (1995), sowie Leon et al. (1998) protokollierten die zirkadiane Rhythmik der Temperatur bei Mäusen und konnten nachts insgesamt höhere Werte als tags darstellen. Kozak et al. (1995) konnten auch die höhere Aktivität in der Dunkelphase ermitteln. In Abbildung 17 zeigen wir, dass die Temperatur morgens signifikant höher war als abends. Für Versuche, in denen die Temperatur zur Darstellung eines Krankheitsverlaufs gemessen wird, ist es aufgrund dieser signifikanter Unterschiede zwischen Tag und Nacht, bzw. morgens und abends von großer Bedeutung, Eingriffe wie eine Sepsisinduktion, zu den gleichen Tageszeiten vorzunehmen. Wir konnten somit zeigen, dass Versuche, die zu unterschiedlichen Tageszeiten an Mäusen durchgeführt wurden, nicht miteinander vergleichbar sind.

Erkrankte Säugetiere stellen die Nahrungsaufnahme ein. Es kommt im Krankheitsverlauf zu einem Gewichtsverlust. Nemzek et al. (2004) bezeichnen einen Gewichtsverlust als allgemeines Zeichen von Krankheit. Daher wird der Gewichtsverlust auch häufig zur Bewertung der Krankheitsschwere, z.B. in Form von Scores berücksichtigt (Acred et al. 1994; Belikoff und Buras 2008; Huet et al. 2013; Morton und Griffiths 1985; Remick et al. 2002). Der Gewichtsverlust ist ein geeigneter Parameter zum Erkennen von Krankheit bei Tieren.

Die Körpertemperatur ist abhängig von der Aktivität. Eine Hypothermie nach Sepsis lässt sich durch die verminderte Aktivität, verursacht durch die Erkrankung erklären

(Kozak et al. 1995). Da die Hypothermie ein Zeichen von Krankheit bei Mäusen ist, empfehlen Olfert und Godson (2000) die Überwachung der Körpertemperatur bei jedem Tiermodell für Infektionen. Soothill et al. (1992) untersuchten in ihrem Sepsismodell Temperatur und klinische Zeichen unabhängig voneinander und zeigten, dass der Temperaturabfall unter 34 °C früher auftrat als die anderen klinischen Abbruchkriterien. Die Temperaturmessung kann rektal, oder zum Beispiel per implantiertem Transponder (Kort et al. 1998; Leon et al. 1998) erfolgen. Wir entschieden uns für die rektale Messung, da wir auf einen zusätzlichen Eingriff verzichten wollten. Für zukünftige Versuche ist zu bedenken, dass auch die rektale Messung Stress für die Maus bedeutet (Kort et al. 1998). Eine Möglichkeit, auch diesen zu vermeiden wäre die Einführung einer Messung an der Hautoberfläche, wie von Nemzek et al. (2004) durchgeführt.

5.3.4 Krankheitsscore

Unser Krankheitsscore wurde von Schleifer (2015) entwickelt und ist angelehnt an den von Morton und Griffiths (1985) erstmals vorgeschlagenen Krankheitsscore. Krankheitsscores finden sich natürlich auch in der Klinik. Singer et al. (2016) empfehlen den SOFA-Score als Diagnosekriterium für Sepsis des Menschen. Daher ist es sicherlich auch sinnvoll, die Krankheit im Tiermodell anhand eines Scores zu bewerten (Huet et al. 2013; Shrum et al. 2014).

In Tierversuchen erfolgt die Einschätzung der Krankheitsschwere hauptsächlich anhand der Überlebenszeit. Wir wollten mit unserem Krankheitsscore die Schwere der Erkrankung zusätzlich bereits vor dem Tod, bzw. vor Erreichen der Abbruchkriterien, bewerten. Auch ist es so möglich, die Krankheitsschwere bei Mäusen zu unterscheiden, die keine letale Dosis bzw. eine unterschiedlich hohe Bakterienlast erhalten. Da die Definition von Abbruchkriterien von großer Wichtigkeit ist (Belikoff und Buras 2008), bietet es sich an, die im Rahmen der Beobachtung erhobenen Parameter zu verwenden, um die Krankheitsschwere bereits im Krankheitsverlauf zu dokumentieren. Bei Tieren mit stärker ausgeprägten Krankheitszeichen können dann z.B. häufigere Kontrollen eingeplant werden (Huet et al. 2013).

Ein rein klinischer Krankheitsscore bedeutet in der Regel die geringste Belastung für Versuchstiere. Hier ist es von großer Wichtigkeit das normale Verhalten eines Tieres zu kennen (Morton und Griffiths 1985). Wir beurteilten die Klinik der Mäuse auch immer im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe. Nachteil der klinischen Einschätzung ist, dass sie in gewisser Weise subjektiv ist (Hawkins 2002; Morton und Griffiths 1985). Deswegen erhoben wir unseren Krankheitsscore verblindet. In neueren Arbeiten wurden validierte klinische Scores, wie der „*M-CASS*“ von Huet et al. (2013) und der „*murine sepsis score*“ von Shrum et al. (2014) etabliert.

Temperatur- und Gewichtsverlust, sowie klinische Krankheitssymptome, wie in unserem Krankheitsscore erhoben, sind bekannte Zeichen einer progredienten generalisierten Erkrankung (Kort et al. 1998) wie der Sepsis und somit zur Bewertung der Krankheitsschwere geeignet.

5.4 Vergleich der Modelle

Als gängige Modelle der abdominalen Sepsis gelten das LPS-, das CLP- und das CASP-Modell. Im LPS-Modell wird LPS, ein Bestandteil gram negativer Bakterien intraperitoneal injiziert. Im CLP-Modell wird der Darm im Rahmen einer Operation punktiert, im CASP-Modell wird der Darm, ebenfalls im Rahmen einer Operation, mit einem Stent versehen.

5.4.1 IPSI versus LPS

Das LPS-Modell ist ein Monoliganden-Modell, in dem Lipopolysaccharid, ein zuvor isolierter Zellbestandteil gram-negativer Bakterien, injiziert wird. Es wurde vor etwa 60 Jahren entwickelt, und weil es seitdem sehr häufig angewandt wurde, ist es entsprechend gut etabliert. Es ist es leicht standardisierbar, unkompliziert in der Durchführung (Gonnert et al. 2011; Lewis et al. 2016; McCarron et al. 2015) und erzeugt Symptome, die klinisch einer Sepsis ähneln (Maier et al. 2004; Rittirsch et al. 2007). Kozak et al. (1995) stellten zum Beispiel eine Hypothermie nach LPS als klinisches Zeichen einer Sepsis dar. Heremans et al. (1990) konnten für das LPS-Modell eine Korrelation zwischen Letalität, sowie klinischem Score und LPS-Dosis zeigen und somit

eine gute Modulierbarkeit der Krankheitsschwere. In den letzten Jahren geriet das LPS-Modell allerdings in Kritik und die Notwendigkeit anderer, besserer Sepsismodelle wurde immer deutlicher. Verschiedene Spezies zeigen unterschiedliche Sensibilität auf LPS. So reagieren Menschen zum Beispiel deutlich empfindlicher als Mäuse und Ergebnisse aus Tierversuchen können nicht auf den Menschen übertragen werden (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Es finden sich diverse Arbeiten, die beschreiben, dass das LPS-Modell der klinischen Situation eines Sepsispatienten nicht entspricht (Belikoff und Buras 2008; Wichterman et al. 1980). Die Zytokinausschüttung im Verlauf nach LPS-Injektion unterscheidet sich deutlich von der eines Menschen mit Sepsis (Buras et al. 2005; Lewis et al. 2016; McCarron et al. 2015; Rittirsch et al. 2007). Vielversprechende Therapievorschläge aus Versuchen im LPS-Modell konnten die Mortalität der Sepsis beim Menschen nicht senken (Deitch 2005; Maier et al. 2004; Opal et al. 2013). McCloskey et al. (1994) untersuchten die Wirksamkeit von HA-1A, einem Antikörper gegen Endotoxin, der im Tierversuch vielversprechende Erfolge zeigte, bei Patienten mit septischem Schock und fanden keine Reduktion der 14-Tage-Mortalität im Vergleich zur Placebogruppe. Auch die Therapieerfolge mit Ziel auf TNF- α , bei denen im LPS-Modell die Mortalität der Sepsis reduziert wurde, konnten auf den Menschen nicht übertragen werden (Fisher, JR et al. 1996). Opal et al. (2013) untersuchten die Wirksamkeit von Eritoran bei Patienten mit schwerer Sepsis. Hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff am Toll-like Rezeptor 4, an welchem LPS wirkt, welcher in präklinischen Studien Wirksamkeit gezeigt hatte. Es kam zu keinem signifikanten Unterschied der Überlebenszeit im Zeitraum von 28 Tagen bis zu einem Jahr im Vergleich zur Placebo-Gruppe und zu keinem Vorteil durch die Behandlung mit Eritoran.

McCarron et al. (2015) zeigen, dass nach LPS, im Gegensatz zu der Injektion von Stuhl, keine Peritonitis entsteht. Sie bezeichnen die Reaktion auf LPS-Injektion als „sterile Entzündung“, die die Sepsis im Menschen nicht widerspiegelt. Rittirsch et al. (2007) sehen im LPS-Modell zwar kein valides Modell einer Sepsis, jedoch die Möglichkeit die Pathophysiologie einer Endotoxinämie zu untersuchen.

Trotz des geringen Erfolges, der auch bereits in der Fachliteratur thematisiert wurde (Deitch 2005; Riedemann et al. 2003), wird das LPS-Modell auch heute weiterhin genutzt (Liu et al. 2015). Die Sepsisinduktion durch LPS hat den großen Vorteil der

geringen Invasivität. Jedoch die Tatsache, dass es sich um ein Monoliganden-Modell handelt und nur isolierte Zellbestandteile und nicht komplette Bakterien injiziert werden, genügt, um die Notwendigkeit besserer Modelle zu erkennen (Lang et al. 1983). Es ist bekannt, dass die Immunantwort auf Mikroorganismen durch eine Vielzahl von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ausgelöst wird und dass LPS nur eines dieser Vielzahl darstellt (Lewis et al. 2016; Wiersinga et al. 2014).

Bei einer intraabdominellen Sepsis handelt es sich in der Regel um polymikrobielle Infektionen (Gonnert et al. 2011). Trotzdem wird im LPS-Modell häufig nur LPS aus einem Bakterienstamm, meist *E. coli*, verwendet (Huet et al. 2013; Kozak et al. 1995; Liu et al. 2015; McCarron et al. 2015). Da sich LPS nur in gram-negativen Bakterien findet, wird die gram-positive Sepsis im LPS-Modell nicht berücksichtigt (Lewis et al. 2016; Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Hier kann das IPSI-Modell als Alternative in Frage kommen, denn es erfüllt zusätzlich zu den im LPS-Modell erfüllten Kriterien auch den Anspruch einer polymikrobiellen Infektion. Die Zytokinausschüttung nach IPSI ist ein aktuelles Forschungsvorhaben unserer Arbeitsgruppe.

5.4.2 IPSI versus CLP und CASP

Das CLP-Modell, welches auch gelegentlich als „Goldstandard der Sepsismodelle“ (Gobbetti et al. 2014) bezeichnet wird, sowie das CASP-Modell sind Modelle für eine polymikrobielle Sepsis. Rittirsch et al. (2007) beschreiben CASP und CLP als Modelle einer polymikrobiellen Sepsis mit sehr hoher Mortalität. Die Zytokinausschüttung in beiden Modellen stellt die des Menschen besser dar als die nach LPS-Injektion (Buras et al. 2005).

Verschiedene Autoren beschreiben Temperatur- und Gewichtsveränderungen für CLP und CASP, die auch wir für IPSI darstellen konnten und somit die gleichen klinischen Zeichen einer Sepsis: Nemzek et al. (2004) fanden in Versuchen der Sepsis durch CLP keinen signifikanten Unterschied im Gewichtsverlust zwischen überlebenden und verstorbenen Mäusen. Diese Beobachtung machten auch wir. Auch die von uns gezeigte Hypothermie im Verlauf der Sepsis wurde bereits dokumentiert. Gobbetti et al. (2014), Hyde et al. (1990), Leon et al. (1998), sowie Tao et al. (2004) zeigten diese im

CLP-Modell und Schleifer (2015) zeigte eine Hypothermie nach CASP. Ebong et al. (1999) zeigten bei zunehmender Größe der Punktionskanüle eine stärkere, bzw. länger andauernde Hypothermie nach CLP.

Für CLP und CASP ist eine Operation, inklusive Narkose notwendig. Im CLP-Modell wird deswegen häufig eine subkutane Flüssigkeitssubstitution durchgeführt (Hubbard et al. 2005; Maier et al. 2004; Tao et al. 2004; Wichterman et al. 1980). Das chirurgische Gewebetrauma fällt im IPSI-Modell weg (Lewis et al. 2016). Somit ist die Sepsisinduktion durch CLP und CASP an sich bereits deutlich belastender als bei IPSI.

Ein großer Vorteil von "*cecal slurry*" Modellen, wie dem IPSI-Modell ist, dass es durch die unkomplizierte Induktion, im Gegensatz zu CLP und CASP, auch in neonatalen Mäusen durchgeführt werden kann (Lewis et al. 2016; Wynn et al. 2007).

Im CLP- und CASP-Modell ist es möglich, einen subletalen Krankheitsverlauf zu erzeugen (Maier et al. 2004; Zantl et al. 1998). Im CLP-Modell soll die Einstellung der Krankheitsschwere durch Variation des ligierten Darmvolumens sowie Anzahl und Größe der Punktionen erfolgen (Belikoff und Buras 2008; Ebong et al. 1999). Belikoff und Buras (2008) sowie Wichterman et al. (1980) zufolge ist das CLP-Modell gut reproduzierbar. Hier gibt es allerdings unterschiedliche Ergebnisse. Zantl et al. (1998) fanden beim CLP-Modell eine Letalität von 100 %, wenn das gesamte Caecum ligiert war, unabhängig von der Zahl der Punktionen. Sie kritisieren am CLP-Modell die Schwierigkeit, immer das gleiche Darmvolumen zu ligieren und bezeichnen es deswegen als schlecht reproduzierbar. Je mehr Caecum ligiert ist, desto höher ist die Mortalität (Singleton und Wischmeyer 2003). Buras et al. (2005) und auch Singleton und Wischmeyer (2003) sehen hier einen Grund für unterschiedliche Ergebnisse aus Studien mit dem CLP-Modell, denn es wird selten angegeben, wie viel Caecum ligiert wurde. Maier et al. (2004) verglichen die Letalität nach CLP mit einfacher bzw. zweifacher Punktion des Caecums mit einer Punktionskanüle von 18 G und konnten keinen signifikanten Unterschied feststellen. Buras et al. (2005) kritisieren, dass die Bakterienfreisetzung aus dem Darm nach Ligatur und Punktion unkontrolliert erfolgt. Die Modulierbarkeit des CLP-Modells ist also kritisch zu hinterfragen.

Im CASP-Modell kann der Stent in unterschiedlichen Größen gewählt werden. Es besteht eine eindeutige Korrelation zwischen Stentgröße und Letalität, sodass hier die Überlebenszeit gut steuerbar ist (Maier et al. 2004; Zantl et al. 1998), was für ein Sepsismodell grundsätzlich wünschenswert ist. Je nach Arbeitsgruppe finden sich jedoch ebenfalls unterschiedliche Daten bezüglich des Überlebens bei gleichem Stentdurchmesser. Die Letalität der CASP bei der Stentgröße von 14 G lag sowohl bei Maier et al. (2004) als auch bei Zantl et al. (1998) nach 48 Stunden bei 100 %. Bei einer Stent-Größe von 18 G kam es allerdings bei Zantl et al. (1998) zu einer Letalität von 64 % und bei Maier et al. (2004) zu einer Letalität von 50 %. Die Überlebenszeit nach CASP kann zusätzlich im Zeitraum, in dem der Stent belassen wird variiert werden (Zantl et al. 1998).

Es gibt verschiedene Arbeiten, die die Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs vom Operateur nach CLP und CASP aufzeigen und kritisieren. Sam et al. (1997) sowie Wynn et al. (2007) zeigten dies für das CLP-Modell und Belikoff und Buras (2008) für das CASP-Modell. Belikoff und Buras (2008), sowie Sam et al. (1997) betonen, dass die Operationen gründlich erlernt werden müssen, damit Ergebnisse reproduzierbar sind. Vor Durchführung von Versuchen mit diesen Modellen muss eine längere Vorlaufzeit zum Erlernen der Operationstechnik eingeplant werden. Diese entfällt bei IPSI. Beim IPSI-Modell besteht nur eine äußerst geringe Abhängigkeit von dem Operateur. Während verschiedene Operationstechniken zu einer sehr unterschiedlichen Bakterienfreisetzung nach CLP oder CASP führen können, wird die Bakterienlast in der IPSI allein durch die gewählte Stuhlverdünnung bestimmt. Stuhlbearbeitung und Injektion können im Gegensatz zu der Methodik des CLP- und CASP-Modells leicht erlernt und standardisiert werden (Gonnert et al. 2011).

Im Vergleich zum IPSI-Modell entfallen die Bearbeitungsschritte des Stuhls im CLP- und CASP-Modell. So werden die Tiere also tatsächlich mit ihrer eigenen, unveränderten Darmflora, die auch Anaerobier enthält, konfrontiert. Dies kann im IPSI-Modell nicht gewährleistet werden. Der Wegfall der Anaerobier ist vertretbar, denn die für die intraperitoneale Sepsis besonders relevanten Bakterien (siehe 6.2.2) bleiben vorhanden (Gonnert et al. 2011).

Maier et al. (2004) verglichen CLP und CASP miteinander und kamen zu dem Ergebnis, dass das CASP-Modell den Verlauf der Sepsis, infolge einer diffusen Peritonitis des Menschen, gut darstellt. Bei Relaparotomie nach CASP konnten Maier et al. (2004) Zeichen einer Peritonitis feststellen. Das CLP-Modell bezeichnen Maier et al. (2004) hingegen eher als Modell eines intraabdominellen Abszesses. In Untersuchungen des Situs 24 Stunden nach CLP waren die Punktionsstellen bereits nicht mehr durchlässig. Möglich ist auch eine Beeinträchtigung der Tiere besonders durch die Durchblutungsstörung durch die Ligatur nach CLP. Maier et al. (2004) beschreiben, dass eine diffuse Peritonitis eher zu einer Sepsis führt als ein Abszess. Auch Buras et al. (2005) sehen in der Tatsache, dass sich nach CLP ein Abszess bildet, einen Nachteil. Wenn durch den Abszess die Infektion komplett eingedämmt wird, kommt es zu keiner Sepsis und die Tiere erholen sich vollständig. Therapiemethoden, die eine Abszessbildung fördern, sind also im CLP-Modell erfolgreich, bei Patienten mit septischem Schock jedoch nicht. Insoweit ist das vielgenutzte CLP-Modell tatsächlich auch kein ideales Modell für eine intraabdominelle Sepsis.

Die betrachteten Sepsis Modelle LPS, CLP und CASP haben somit im Vergleich zu unserem IPSI-Modell alle Stärken und Schwächen in Bezug auf die zu Beginn definierten Anforderungen an ein Sepsismodell. Die Klinik einer Sepsis wird bei CLP, CASP und IPSI besser dargestellt als bei LPS. Die Sepsisinduktion ist bei IPSI und LPS minimalinvasiv und die Bakterienlast erfolgt hier kontrolliert. Nachteile, die durch OP und Narkose entstehen, entfallen bei IPSI und LPS. Allerdings ist das Bakterienspektrum im LPS-Modell nicht physiologisch und auch im IPSI-Modell spiegelt die Bakterienlast nur annähernd und nicht gänzlich die physiologische wieder. Im CLP- und CASP-Modell hingegen erfolgt die Infektion tatsächlich mit der eigenen Darmflora. Modulierbarkeit, sowie auch Reproduzierbarkeit konnte für alle verglichenen Modelle gezeigt werden, hier gibt es allerdings Kritikpunkte bezüglich CLP und CASP.

Zusammenfassend eignet sich das IPSI-Modell zur Induktion einer minimalinvasiven, polymikrobiellen Sepsis. Die Krankheitsschwere lässt sich durch Wahl der Stuhlverdünnung modulieren. Dies kann anhand nichtinvasiv erhobener klinischer Parameter bestätigt werden.

Die intraperitoneale Injektion stellt eine verhältnismäßig geringe Belastung für die Mäuse dar und die Sham-Injektion erzeugt keine Erkrankung. Im Vergleich mit den anderen gängigen Modellen schneidet die IPSI sehr gut ab.

5.5 Kritik

Wie in der Fachliteratur bereits thematisiert (Angus und van der Poll 2013; Buras et al. 2005; Tracey und Abraham 1999; Rittirsch et al. 2007), haben die vielfältigen Untersuchungen der Sepsis im Tierversuch noch zu keinem Durchbruch in der Therapie der Sepsis des Menschen geführt. Der Nutzen der Tierversuche wird hier daher insgesamt kritisch hinterfragt. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Erfolg ist, dass die Tiermodelle der Sepsis im Menschen immer noch nicht gut genug entsprechen und Ergebnisse daher nicht auf den Menschen übertragbar sind (Deitch 1998). So ist die Suche nach einem Sepsismodell, das die Krankheit im Menschen besser repräsentiert, immer noch ein Thema. Wie Fink und Heard (1990) schreiben: *„Die Tatsache, dass es so viele Modelle für Sepsis und septischen Schock gibt zeigt, dass keines von ihnen perfekt ist“*. Möglicherweise sind die verschiedenen Modelle sogar notwendig und es ist sinnvoll, eine Therapie an verschiedenen Tiermodellen zu testen, denn die Sepsis im Menschen ist sehr heterogen (Deitch 2005). In dieser Arbeit wurden die Vorteile des IPSI-Modells insbesondere gegenüber anderen Modellen dargestellt. Hier wurde deutlich, dass IPSI gut geeignet ist, um die polymikrobielle, intrabdominale Sepsis im Mausmodell zu untersuchen. Aber auch in unserem IPSI-Modell gibt es Schwachstellen.

Die Sepsis des Menschen ist in der Regel von einem längeren Verlauf geprägt als der in Tiermodellen. Des Weiteren erfolgt beim Menschen in aller Regel eine Therapie (Buras et al. 2005). Wie in der Einleitung beschrieben, erfolgt die Therapie der Sepsis durch Antibiotikatherapie, Volumensubstitution und Kreislauftherapie, sowie auch invasiver Beatmung. In den meisten Tiermodellen für Sepsis wird keine Therapie (Angus und van der Poll 2013) und wenn doch, nicht mit der des Menschen vergleichbar, durchgeführt. Zum Beispiel wird die Therapie im Tiermodell oft früher begonnen als beim Menschen (Esmon 2004). In der Sepsisbehandlung des Menschen sind der Infektfokus und die Sensibilität auf Antibiotika zunächst nicht bekannt, wohingegen im Tiermodell von vorneherein die passende Antibiose ausgewählt werden kann (Esmon 2004). Wie Fink

und Heard (1990) beschreiben, müsste man septische Tiere auf einer Tierintensivstation behandeln, um den Verlauf der Sepsis im Menschen wirklich zu repräsentieren.

Wie wir zeigen konnten, ist es im IPSI-Modell möglich, einen letalen und einen subletalen Verlauf der Sepsis darzustellen. Hier sind durchaus auch Untersuchungen mit Antibiose und Volumensubstitution denkbar, auf deren Grundlage man wichtige Erkenntnisse zum Verlauf der Krankheit gewinnen könnte. Hier wäre es sicherlich interessant weitere Stuhlverdünnungen zwischen 1:6 und 1:9 zu untersuchen.

In unserem Modell, wie auch in den meisten anderen Sepsismodellen, wurden die Versuche an jungen und gesunden Tieren durchgeführt, wohingegen Patienten, die an einer Sepsis versterben, häufig älter und vorerkrankt oder Neonaten sind (Angus und van der Poll 2013; Esmon 2004; Rittirsch et al. 2007). Die IPSI in älteren bzw. neonatalen Mäusen zu untersuchen, sollte in Erwägung gezogen werden. Im Gegensatz zu CLP und CASP, ist die Sepsisinduktion per IPSI in Neonaten möglich (Lewis et al. 2016; Wynn et al. 2007).

Da wir in unserem Modell viel Wert darauf legen, dass es minimalinvasiv ist und keine Operation und Narkose notwendig sind, fehlen uns bisher wichtige objektive Parameter, wie die Hämodynamik, um Krankheitsphasen mit Hyper- und Hypodynamik zu erfassen, wie Brealey et al. (2004) in ihrem „*fecal slurry*“-Modell in Ratten oder Tao et al. (2004) im CLP-Modell.

Auch haben wir bisher keine Sepsis- und Entzündungsparameter, zum Beispiel Procalcitonin oder IL-6 erfasst. Die Zytokine im Verlauf der Sepsis zu untersuchen, ist aktuell noch Teil unseres Forschungsvorhabens.

Methodisch besteht Verbesserungsbedarf in der Durchführung der Stuhlentnahme, sowie der Beurteilung der Stuhlzusammensetzung.

Wir entnehmen den Stuhl, der zur IPSI verwendet wurde, aus dem Caecum von Mäusen, welche allein als Stuhlsponder dienen. Dadurch, dass wir nur Stuhl aus dem Caecum und nicht den gesamten Darminhalt entnehmen, um eine hohe Standardisierung zu erreichen, wurden verhältnismäßig viele Stuhldonoren benötigt. In anderen Modellen, die der IPSI ähneln, wird der Stuhl von Menschen gespendet

(Gonnert et al. 2011) oder es werden Stuhlpellets aus dem Käfig verwendet (Lang et al. 1983). Hierfür müssen keine Tiere zusätzlich angeschafft und getötet werden. Die Bakterienzusammensetzung dieser Stuhlproben ist allerdings kritisch in Bezug auf ihre Vergleichbarkeit mit der von frischem Stuhl der gleichen Spezies zu sehen. Brealey et al. (2004) arbeiteten in ihrem Stuhlinjektionsmodell mit Ratten und injizierten eine Lösung, hergestellt aus dem gesamten Darminhalt eines Spendertieres. Shrum et al. (2014) entnahmen Stuhl von Mäusen, die als reine Donoren galten, so wie wir, auch nur aus dem Caecum. Es sollte überprüft werden, ob die IPSI auch mit einer Stuhllösung, welche aus dem gesamten Darminhalt von Stuhlspendertieren hergestellt wurde, möglich ist, um so die Zahl der benötigten Tiere zu reduzieren. Hier ist dann die Bakterienzusammensetzung erneut zu untersuchen.

Wir untersuchten unsere verschiedenen Stuhlproben mit einer Quantifizierung durch einen 3-Ösen-Ausstrich auf CHROMagar™ MH Orientation-Platten. Damit war eine schnelle und unkomplizierte grobe Orientierung möglich. Wir konnten so aber keine Unterschiede der absoluten Bakterienquantität der verschiedenen Stuhlverdünnungen darstellen, obwohl diese klinisch signifikant vorhanden waren. Eine Verdünnung des Stuhls und Auszählung von CFUs wäre hier von großem Vorteil und sollte in Zukunft zusätzlich erfolgen. Das IPSI-Modell ist noch zu optimieren, bietet tatsächlich aber auch viele Möglichkeiten, die von uns bislang nicht voll ausgeschöpft wurden.

Um Ansätze einer Therapie zu finden ist es notwendig, die Pathophysiologie einer Krankheit und ihres Verlaufs zu kennen. Hier gab es in den letzten 30 Jahren durch Versuche in Tiermodellen große Fortschritte in Bezug auf die Sepsis, auch wenn es bisher keine erfolgreiche Therapiemethode gibt. Wie Rittirsch et al. (2007) schreiben: *„Tiermodelle sind sinnvoll, wenn wir ihre Grenzen verstehen“*. Auch das IPSI-Modell hat Grenzen, aber es ist mit einigen Modifikationen gut geeignet, neue Erkenntnisse zum Beispiel bezüglich der Zytokinausschüttung im Verlauf der Sepsis oder auch bezüglich möglicher neuer Therapieansätze zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Etablierung der kontrollierten Sepsisinduktion per intraperitonealer Stuhlinjektion (IPSI) im Mausmodell. Wir entnahmen Stuhl aus dem Caecum von Mäusen und stellten durch Vermischen, Filtern und Verdünnen eine injizierbare Lösung her, welche dann in den Verdünnungen 1:3, 1:6 oder 1:9 intraperitoneal injiziert wurde. Diese Stuhlpräparation mit anschließender Lagerung bei 4 - 6 °C über maximal 96 Stunden führte zu keiner signifikanten Veränderung der Stuhlzusammensetzung. Nach Sepsisinduktion durch IPSI verglichen wir die Auswirkungen der verschiedenen Stuhlverdünnungen anhand der Parameter Gewichts- und Temperaturveränderungen, Überlebenszeit, sowie durch unseren Krankheitsscore nach definierten Zeitpunkten. Wir konnten zeigen, dass das IPSI-Modell zuvor definierte Anforderungen an ein optimales Tiermodell erfüllt.

Das IPSI-Modell ist ein gut modulierbares Sepsismodell. Wir zeigten, dass ein letaler, sowie ein subletaler Krankheitsverlauf erzeugt werden kann. Krankheitsschwere und Überlebenszeit sind durch die Wahl der injizierten Stuhlverdünnung variabel. Wir konnten einen signifikanten Gewichtsverlust nach IPSI mit allen getesteten Stuhlverdünnungen feststellen. Zu einem signifikanten Temperaturverlust kam es bei der 1:3 und 1:6 Verdünnung. Hierbei korrelierte die Hypothermie mit der Krankheitsschwere.

Im Vergleich zu den Modellen LPS, CLP und CASP zeigt sich das IPSI-Modell als gute Alternative. Das IPSI-Modell ist, wie das LPS-Modell, minimalinvasiv und führt zu einer kontrollierten Infektion mit bekannter Bakterienlast. Zusätzlich hat unser IPSI-Modell den Vorteil polymikrobiell zu sein. Dies konnten wir in der Peritoneallavage nach IPSI nachweisen. Bei LPS ist dies nicht der Fall und dies ist der größte Kritikpunkt am LPS-Modell (Lang et al. 1983). Schwachstellen bei CLP und CASP sind die notwendige Operation und Narkose (Belikoff und Buras 2008; Wynn et al. 2007; Sam et al. 1997; Wynn et al. 2007), welche bei IPSI entfallen. Die intraperitoneale Injektion stellt im Vergleich zu einer Operation in Narkose eine verhältnismäßig geringe Belastung für die Mäuse dar. Die Sham-Injektion erzeugt keine Erkrankung.

Insgesamt bietet das hier entwickelte IPSI-Modell als polymikrobielles, reproduzierbares und gering invasives Modell die Möglichkeit die abdominell bedingte Sepsis im Mausmodell zu induzieren. Dies dient als Grundlage für weitere Untersuchungen von Entstehung, Verlauf und Therapie der Sepsis.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vorgehen bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion.	12
Abb. 2: Technik 3-Ösen-Ausstrich:.....	22
Abb. 3: Darstellung verschiedener Bakterienkolonien auf CHROMagar™ MH Orientation (CHROMagar 2017).....	23
Abb. 4: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit wenig Bewuchs.....	25
Abb. 5: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit mäßigem Bewuchs.	25
Abb. 6: Beispiel Stuhlausstrich als Drei-Ösen-Ausstrich mit reichlichem Bewuchs.	26
Abb. 7: MALDI-TOF MS Gesamtspektrum	27
Abb. 8: Filterherstellung	28
Abb. 9: Protokoll zur Beobachtung des Krankheitsgrades im Verlauf nach IPSI.....	30
Abb. 10: Relative Häufigkeit des Vorkommens der Bakterienstämme in den Stuhlproben von 20 Mäusen.....	35
Abb. 11: Vergleich der Bakterienquantität in frischem Stuhl und nach Lagerung bei -20 °C	37
Abb. 12: Bakterienquantität einer Stuhlprobe im Verlauf der Lagerung bei 4 - 6 °C.....	38
Abb. 13: Vergleich der dargestellten Bearbeitungsschritte des Stuhls	39
Abb. 14: Vergleich der zur IPSI verwendeten 1:3 Verdünnung mit der Peritoneallavage	40
Abb. 15: Gewichtsveränderung von unbehandelten Mäusen über die Nacht.....	41
Abb. 16: Gewichtsveränderung von unbehandelten Mäusen über den Tag	42
Abb. 17: Temperaturveränderung von unbehandelten Mäusen über den Tag	43
Abb. 18: Prozentuale Gewichtsveränderungen von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9	45
Abb. 19: Prozentuale Temperaturveränderungen von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9	46
Abb. 20: Krankheitsscore von Mäusen 12 Stunden nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9	47
Abb. 21: Darstellung des Überlebens von Mäusen nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9 im Verlauf von 48 Stunden	48

Abb. 22: Darstellung des Verlaufs des Krankheitsscores von Mäusen nach IPSI mit den Stuhlverdünnungen 1:3, 1:6 und 1:9 49

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: SOFA-Score..... 11

9. Literaturverzeichnis

Acred, P.; Hennessey, T. D.; MacArthur-Clark, J. A.; Merrikin, D. J.; Ryan, D. M.; Smulders, H. C. et al. (1994): Guidelines for the welfare of animals in rodent protection tests: A Report from the Rodent Protection Test Working Party. In: *Lab Anim* 28, S. 13–18. DOI: 10.1258/002367794781065870

Angus, Derek C. (2011): The Search for Effective Therapy for Sepsis: Back to the Drawing Board? In: *JAMA* 306, S. 2614–2615. DOI: 10.1001/jama.2011.1853

Angus, Derek C.; van der Poll, Tom (2013): Severe sepsis and septic shock. In: *The New England journal of medicine* 369, S. 840–851. DOI: 10.1056/NEJMra1208623

Barbuddhe, Sukhadeo B.; Maier, Thomas; Schwarz, Gerold; Kostrzewa, Markus; Hof, Herbert; Domann, Eugen et al. (2008): Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. In: *Applied and environmental microbiology* 74, S. 5402–5407. DOI: 10.1128/AEM.02689-07

Belikoff, B.; Buras, J. A. (2008): A Practical Approach to Animal Models of Sepsis. In: P. Michael Conn (Hg.): *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press Inc

Brealey, D.; Karyampudi, S.; Jacques, T. S.; Novelli, M.; Stidwill, R.; Taylor, V. et al. (2004): Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286, S. 7. DOI: 10.1152/ajpregu.00432.2003

Brunkhorst, F. M. (2006): Epidemiologie, Ökonomie und Praxis -- Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 41, S. 43–44. DOI: 10.1055/s-2005-921227

Buras, Jon A.; Holzmann, Bernhard; Sitkovsky, Michail (2005): Animal models of sepsis: setting the stage. In: *Nature reviews. Drug discovery* 4, S. 854–865. DOI: 10.1038/nrd1854

- Dan, M.; Richardson, J.; Miliotis, M. D.; Koornhof, H. J. (1989): Comparison of preservation media and freezing conditions for storage of specimens of faeces. In: *Journal of medical microbiology* 28, S. 151–154. DOI: 10.1099/00222615-28-2-151
- Deitch, E. A. (1998): Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 9, S. 1–11
- Deitch, E. A. (2005): Rodent models of intra-abdominal infection. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 24 Suppl 1, S. 19–23
- Ebong, S.; Call, D.; Nemzek, J.; Bolgos, G.; Newcomb, D.; Remick, D. (1999): Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. In: *Infection and immunity* 67, S. 6603–6610
- Esmon, Charles T. (2004): Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? In: *Critical care medicine* 32, S219-S222. DOI: 10.1097/01.CCM.0000127036.27343.48
- Fink, M. P.; Heard, S. O. (1990): Laboratory models of sepsis and septic shock. In: *The Journal of surgical research* 49, S. 186–196
- Fisher, C. J., JR; Agosti, J. M.; Opal, S. M.; Lowry, S. F.; Balk, R. A.; Sadoff, J. C. et al. (1996): Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. In: *The New England journal of medicine* 334, S. 1697–1702. DOI: 10.1056/NEJM199606273342603
- Fleischmann, Carolin; Thomas-Rueddel, Daniel O.; Hartmann, Michael; Hartog, Christiane S.; Welte, Tobias; Heublein, Steffen et al. (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. In: *Deutsches Arzteblatt international* 113, S. 159–166. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159
- Fuchs, D. (2010): Die Rolle der kommensalen Darmflora bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis der C57BL/6-Maus. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät, Charité Universitätsmedizin Berlin
- Gobbetti, Thomas; Coldewey, Sina M.; Chen, Jianmin; McArthur, Simon; Le Faouder, Pauline; Cenac, Nicolas et al. (2014): Nonredundant protective properties of FPR2/ALX

in polymicrobial murine sepsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, S. 18685–18690. DOI: 10.1073/pnas.1410938111

Gonnert, F. A.; Recknagel, P.; Seidel, M.; Jbeily, N.; Dahlke, K.; Bockmeyer, C. L. et al. (2011): Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. In: *The Journal of surgical research* 170, S. 34. DOI: 10.1016/j.jss.2011.05.019

Hall, M. J.; Williams, S. N.; DeFrances, C. J.; Golosinskiy, A. (2011): Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. In: *NCHS data brief*, S. 1–8

Hamaya, Y.; Takeda, T.; Dohi, S.; Nakashima, S.; Nozawa, Y. (2000): The effects of pentobarbital, isoflurane, and propofol on immediate-early gene expression in the vital organs of the rat. In: *Anesthesia and analgesia* 90, S. 1177–1183

Hawkins, P. (2002): Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. In: *Laboratory animals* 36, S. 378–395. DOI: 10.1258/002367702320389044

Heremans, H.; van Damme, J.; Dillen, C.; Dijkmans, R.; Billiau, A. (1990): Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. In: *The Journal of experimental medicine* 171, S. 1853–1869

Hubbard, William J.; Choudhry, Mashkoor; Schwacha, Martin G.; Kerby, Jeffrey D.; Rue, Loring W.; Bland, Kirby I.; Chaudry, Irshad H. (2005): CECAL LIGATION AND PUNCTURE. In: *Shock* 24, S. 52–57. DOI: 10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e

Huet, O.; Ramsey, D.; Miljavec, S.; Jenney, A.; Aubron, C.; Aprico, A. et al. (2013): Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 39, S. 488–494. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182939831

Hyde, S. R.; Stith, R. D.; McCallum, R. E. (1990): Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. In: *Infection and immunity* 58, S. 619–624

König, B. (2012): The behaviour of the house mouse. In: Hans J. Hedrich (Hg.): *The laboratory mouse*. 2nd ed. London: Academic Press/Elsevier, S. 367–381

- Kort, W. J.; Hekking-Weijma, J. M.; TenKate, M. T.; Sorm, V.; VanStrik, R. (1998): A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. In: *Laboratory animals* 32, S. 260–269
- Kozak, W.; Conn, C. A.; Klir, J. J.; Wong, G. H.; Kluger, M. J. (1995): TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. In: *The American journal of physiology* 269, S. 9
- Lagu, Tara; Rothberg, Michael B.; Shieh, Meng-Shiou; Pekow, Penelope S.; Steingrub, Jay S.; Lindenauer, Peter K. (2012): Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. In: *Critical care medicine* 40, S. 754–761. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318232db65
- Lang, C. H.; Bagby, G. J.; Bornside, G. H.; Vial, L. J.; Spitzer, J. J. (1983): Sustained hypermetabolic sepsis in rats: characterization of the model. In: *The Journal of surgical research* 35, S. 201–210
- Lee, S. W.; Feingold, D. L.; Carter, J. J.; Zhai, C.; Stapleton, G.; Gleason, N.; Whelan, R. L. (2003): Peritoneal macrophage and blood monocyte functions after open and laparoscopic-assisted cecectomy in rats. In: *Surgical endoscopy* 17, S. 1996–2002. DOI: 10.1007/s00464-003-8154-5
- Leon, L. R.; White, A. A.; Kluger, M. J. (1998): Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. In: *The American journal of physiology* 275, S. 77
- Lewis, Anthony J.; Seymour, Christopher W.; Rosengart, Matthew R. (2016): Current Murine Models of Sepsis. In: *Surgical infections* 17, S. 385–393. DOI: 10.1089/sur.2016.021
- Liu, Ying-Hua; Li, Xiang-Yong; Chen, Chih-Yu; Zhang, Hong-Man; Kang, Jing X. (2015): Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice. In: *Marine drugs* 13, S. 1026–1036. DOI: 10.3390/md13021026
- Lohner, R.; Schwederski, M.; Narath, C.; Klein, J.; Duerr, G. D.; Torno, A. et al. (2013): Toll-Like Receptor 9 Promotes Cardiac Inflammation and Heart Failure during Polymicrobial Sepsis. In: *Mediators of inflammation* 2013. DOI: 10.1155/2013/261049

- Maier, S.; Traeger, T.; Westerholt, A.; Heidecke, C.-D. (2005): Besonderheiten der abdominalen Sepsis. In: *Chirurg* 76, S. 829–836. DOI: 10.1007/s00104-005-1066-2
- Maier, Stefan; Traeger, Tobias; Entleutner, Markus; Westerholt, Alexandra; Kleist, Britta; Hüser, Norbert et al. (2004): Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: Two distinct animal models for polymicrobial sepsis. In: *Shock* 21, S. 505–512. DOI: 10.1097/01.shk.0000126906.52367.dd
- McCarron, E. P.; Williams, D. P.; Antoine, D. J.; Kipar, A.; Lemm, J.; Stehr, S.; Welters, I. D. (2015): Exploring the translational disconnect between the murine and human inflammatory response: analysis of LPS dose-response relationship in murine versus human cell lines and implications for translation into murine models of sepsis. In: *Journal of inflammation research* 8, S. 201–209. DOI: 10.2147/JIR.S89097
- McCloskey, R. V.; Straube, R. C.; Sanders, C.; Smith, S. M.; Smith, C. R. (1994): Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESSTrial Study Group. In: *Annals of internal medicine* 121, S. 1–5
- Morton, D. B.; Griffiths, P. H. (1985): Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. In: *The Veterinary record* 116, S. 431–436
- Nemzek, J. A.; Xiao, H. Y.; Minard, A. E.; Bolgos, G. L.; Remick, D. G. (2004): Humane endpoints in shock research. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 21, S. 17–25. DOI: 10.1097/01.shk.0000101667.49265.fd
- Olfert, E. D.; Godson, D. L. (2000): Humane endpoints for infectious disease animal models. In: *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 41, S. 99–104
- Opal, Steven M.; Laterre, Pierre-Francois; Francois, Bruno; LaRosa, Steven P.; Angus, Derek C.; Mira, Jean-Paul et al. (2013): Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis. The ACCESS randomized trial. In: *JAMA* 309, S. 1154–1162. DOI: 10.1001/jama.2013.2194
- Parker, S. J.; Watkins, P. E. (2001): Experimental models of gram-negative sepsis. In: *The British journal of surgery* 88, S. 22–30. DOI: 10.1046/j.1365-2168.2001.01632.x

Poli-de-Figueiredo, Luiz F.; Garrido, Alejandra G.; Nakagawa, Naomi; Sannomiya, Paulina (2008): Experimental models of sepsis and their clinical relevance. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 30 Suppl 1, S. 53–59. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318181a343

Remick, Daniel G.; Bolgos, Gerald R.; Siddiqui, Javed; Shin, Jungsoon; Nemzek, Jean A. (2002): Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 17, S. 463–467

Rhee, Chanu; Gohil, Shruti; Klompas, Michael (2014): Regulatory Mandates for Sepsis Care — Reasons for Caution. In: *N Engl J Med* 370, S. 1673–1676. DOI: 10.1056/NEJMp1400276

Rhodes, Andrew; Evans, Laura E.; Alhazzani, Waleed; Levy, Mitchell M.; Antonelli, Massimo; Ferrer, Ricard et al. (2017): Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. In: *Critical care medicine* 45, S. 486–552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255

Riedemann, N. C.; Guo, R. F.; Ward, P. A. (2003): Novel strategies for the treatment of sepsis. In: *Nature medicine* 9, S. 517–524. DOI: 10.1038/nm0503-517

Rittirsch, Daniel; Hoesel, L. Marco; Ward, Peter A. (2007): The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. In: *journal of leukocyte biology* 81, S. 137–143. DOI: 10.1189/jlb.0806542

Sam, A. D.; Sharma, A. C.; Law, W. R.; Ferguson, J. L. (1997): Splanchnic vascular control during sepsis and endotoxemia. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2, S. 92

Saraka, N. D.; Money, M.; Doumbia, S.; CISSE, Souleymane; Odi, N.; Faye, K. H.; DOSSO, M. (2015): The effects of storage conditions on the viability of enteropathogenic bacteria in biobanking of human stools. Cases of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* Typhimurium and *Vibrio cholerae* O: 1. In: *Afr. J. Biotechnol.* 14, S. 38–41. DOI: 10.5897/AJB2014.13668

Schleifer, J. A. (2015): Die Rolle von Toll like Rezeptor 9 für die Entstehung einer pulmonalen Inflammation im Rahmen einer extrapulmonalen, polymikrobiellen Sepsis. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- Seymour, Christopher W.; Liu, Vincent X.; Iwashyna, Theodore J.; Brunkhorst, Frank M.; Rea, Thomas D.; Scherag, Andre et al. (2016): Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315, S. 762–774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288
- Seymour, Christopher W.; Rea, Thomas D.; Kahn, Jeremy M.; Walkey, Allan J.; Yealy, Donald M.; Angus, Derek C. (2012): Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 186, S. 1264–1271. DOI: 10.1164/rccm.201204-0713OC
- Shrum, B.; Anantha, R. V.; Xu, S. X.; Donnelly, M.; Haeryfar, S. M.; McCormick, J. K.; Mele, T. (2014): A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. In: *BMC research notes* 7, S. 233. DOI: 10.1186/1756-0500-7-233
- Singer, Mervyn; Deutschman, Clifford S.; Seymour, Christopher Warren; Shankar-Hari, Manu; Annane, Djillali; Bauer, Michael et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315, S. 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
- Singleton, K. D.; Wischmeyer, P. E. (2003): Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 35, S. 486–491
- Soothill, J. S.; Morton, D. B.; Ahmad, A. (1992): The HID50 (hypothermia-inducing dose 50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. In: *International journal of experimental pathology* 73, S. 95–98
- Steinlechner, S. (2012): Biological rhythms of the mouse. In: Hans J. Hedrich (Hg.): *The laboratory mouse*. 2nd ed. London: Academic Press/Elsevier, S. 383–407
- Stevenson, Elizabeth K.; Rubenstein, Amanda R.; Radin, Gregory T.; Wiener, Renda Soylemez; Walkey, Allan J. (2014): Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. In: *Critical care medicine* 42, S. 625–631. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000026
- Tao, Weike; Deyo, Donald J.; Traber, Daniel L.; Johnston, William E.; Sherwood, Edward R. (2004): Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused

by cecal ligation and puncture in mice. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 21, S. 31–37. DOI: 10.1097/01.shk.0000101673.49265.5d

Tracey, K. J.; Abraham, E. (1999): From mouse to man: or what have we learned about cytokine-based anti-inflammatory therapies? In: *Shock (Augusta, Ga.)* 11, S. 224–225

Vandenbergh, J. G. (2008): The House Mouse in Biomedical Research. In: P. Michael Conn (Hg.): *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press Inc

Vincent, J. L.; Moreno, R.; Takala, J.; Willatts, S.; Mendonca, A. de; Bruining, H. et al. (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. In: *Intensive care medicine* 22, S. 707–710

Walkey, Allan J.; Lagu, Tara; Lindenauer, Peter K. (2015): Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. In: *Annals of the American Thoracic Society* 12, S. 216–220. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201411-498BC

Weinstein, W. M.; Onderdonk, A. B.; Bartlett, J. G.; Gorbach, S. L. (1974): Experimental Intra-Abdominal Abscesses in Rats: Development of an Experimental Model. In: *Infection and immunity* 10, S. 1250–1255

Wichterman, Keith A.; Baue, Arthur E.; Chaudry, Irshad H. (1980): Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. In: *Journal of Surgical Research* 29, S. 189–201. DOI: 10.1016/0022-4804(80)90037-2

Wiersinga, Willem Joost; Leopold, Stije J.; Cranendonk, Duncan R.; van der Poll, Tom (2014): Host innate immune responses to sepsis. In: *Virulence* 5, S. 36–44. DOI: 10.4161/viru.25436

Wynn, J. L.; Scumpia, P. O.; Delano, M. J.; O'Malley, K. A.; Ungaro, R.; Abouhamze, A.; Moldawer, L. L. (2007): Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 28, S. 675–683. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3180556d09

Zantl, N.; Uebe, A.; Neumann, B.; Wagner, H.; Siewert, J. R.; Holzmann, B. et al. (1998): Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. In: *Infection and immunity* 66, S. 2300–2309

Zhu, Yingdi; Qiao, Liang; Prudent, Michel; Bondarenko, Alexandra; Gasilova, Natalia; Möller, Siham Beggah et al. (2016): Sensitive and fast identification of bacteria in blood samples by immunoaffinity mass spectrometry for quick BSI diagnosis. In: *Chem. Sci.* 7, S. 2987–2995. DOI: 10.1039/c5sc04919a

10. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. med. Sven Klaschik für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die netten und konstruktiven Gespräche bedanken.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Folkert Steinhagen und Herrn PD Dr. med. Tobias Hilbert für die nette Betreuung, die guten Diskussionen und Tipps.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Stilla Frede, für ihr außergewöhnliches und unermüdliches Engagement, die große Hilfsbereitschaft, die tollen Ratschläge und Lösungen in den schwierigsten Situationen.

Danke an Herrn Sebastian Senzig für die Zusammenarbeit.

Danke an das Laborteam, besonders an Frau Susanne Schulz, für die Unterstützung.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn, insbesondere an Frau PD. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding und Herrn Dr. med. Marijo Parcina.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, die mich motiviert und unterstützt haben.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern dafür, dass sie immer an mich glauben und immer zu mir halten.