

Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)

Cecal Ligation and Puncture (CLP) oder Colon
Ascendens Stent Peritonitis (CASP).
Eine komparative Studie zweier Tiermodelle für
polymikrobielle Sepsis.

Tobias Traeger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. C.-D. Heidecke, Ernst-Moritz-Arndt-
Universität Greifswald
2. Univ.-Prof. Dr. G.A. Häcker

Die Dissertation wurde am 23.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.11.2003 angenommen.

Für meine Eltern Eva und Jörg Traeger

Inhaltsverzeichnis

1 VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	5
2 EINLEITUNG.....	6
3 WISSENSCHAFTLICHE GRUNDLAGEN UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	8
3.1 Inflammation und Sepsis	8
3.2 Tiermodelle	9
3.2.1 Frühe Sepsismodelle	9
3.2.2 Injektions-/Infusionsmodelle.....	10
3.2.3 Peritonitismodelle.....	13
3.3 Fragestellung der Arbeit.....	17
4 MATERIAL UND METHODIK	18
4.1 Methodik in vivo.....	18
4.1.1 Genehmigung der Tierversuche	18
4.1.2 Tiere und Tierhaltung.....	19
4.1.3 Tiermodelle	19
4.1.4 Überlebenskinetik.....	29
4.1.5 Fotografien	29
4.1.6 Organentnahmen	29
4.2 Methodik ex vivo	30
4.2.1 Histologische Arbeiten.....	30
4.2.2 Bakteriologische Untersuchungen.....	32
4.2.3 Zytokin-Serumspiegel	33
4.3 Gruppeneinteilung	35
4.4 Statistik.....	35
5 ERGEBNISSE	36
5.1 Überlebenskinetiken der CLP und der CASP	36
5.2 Situs 24 h nach OP	37
5.3 Histologie.....	39
5.3.1 HE-Färbung.....	39
5.3.2 Gr-1-Färbung.....	41
5.3.3 Mac-1-Färbung.....	44
5.4 Bakteriologische Untersuchungen	47
5.4.1 Peritoneallavage	47

5.4.2 Leber.....	48
5.4.3 Milz	49
5.4.4 Nieren.....	50
5.4.5 Lunge.....	51
5.4.6 Blut.....	52
5.5 Zytokinspiegel im Serum.....	53
5.5.1 TNF- α	53
5.5.2 IL-1 β	54
5.5.2 IL-10.....	55
6 DISKUSSION	57
7 ZUSAMMENFASSUNG	63
8 LITERATURVERZEICHNIS	65
9 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	71
10 DANKSAGUNG	73

1 Verwendete Abkürzungen

CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CASPI	Colon Ascendens Stent Peritonitis mit Intervention
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CLP(1)	CLP mit einfacher Punktion
CLP(2)	CLP mit zweifacher Punktion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbance Assay
Ex	Explantation
Fc	Fragment constant
FKS	Fetales Kälberserum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Interferon- γ Inducible Protein
i.p.	intraperitoneal
i.m.	intramuskulär
KbE	Kolonie bildende Einheiten
mAb	monoclonal Antibody
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
PBS	Phosphat Buffered Saline
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
Sham-OP	Scheinoperation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
14G	14 Gauge
16G	16 Gauge
18G	18 Gauge

2 Einleitung

Die bakterielle postoperative Peritonitis nach abdominalchirurgischen Eingriffen bleibt trotz größter wissenschaftlicher, chirurgischer und intensivmedizinischer Bemühungen nach wie vor eine Komplikation, die therapeutisch nur schwer in den Griff zu bekommen ist. Häufig kommt es in Folge dessen zu einer systemischen Infektion mit septischem Schock und Multiorganversagen, das in vielen Fällen den Tod des Patienten bedeutet. Einer Studie der TU München zufolge entwickeln nach einem großen bauchchirurgischen Eingriff ca. 10% der Patienten im postoperativen Verlauf eine abdominelle Sepsis, die mit einer Letalität von 25-30% behaftet ist [5]. Die Hauptursache dieser schwerwiegenden Komplikation ist in mehr als 50% der Fälle eine Anastomoseninsuffizienz [5]. Dabei kommt es zu einem kontinuierlichen Austritt von Intestinalsekret, was – je nach Größe der Leckage – zu einer diffusen Infektion der Bauchhöhle führen kann (4 Quadranten-Peritonitis). Im Gegensatz hierzu münden Abszesse oder Fistelungen, welche lokal kontrollierte Infektionen darstellen, nur selten in eine abdominelle Sepsis [5, 81]. Grundsätzlich besteht in jedem Fall eine Entzündung bakterieller Genese, die im schlimmsten Fall über einen septischen Schock zum Tod durch Multiorganversagen führen kann [20].

Zur Pathophysiologie dieser Vorgänge existieren derzeit zwei unterschiedliche Theorien. Die eine sieht das Multiorganversagen als Folge der massiven Überflutung des Organismus durch Bakterien, der das Immunsystem nicht gewachsen ist und deswegen zusammenbricht [10, 11]. Die andere Theorie interpretiert das Geschehen als überschießende Reaktion des Immunsystems auf den bakteriellen Reiz, was durch massive Mediatorfreisetzung die fatalen Folgen für den Organismus selbst hervorruft [80, 84]. Trotz mittlerweile gewonnener Erkenntnisse über die wichtige Rolle der Entzündungsmediatoren, wie z. B. TNF, IFN- γ , IL-1 und IL-6 konnte auf diesem Sektor bisher noch keine therapeutische Strategie etabliert werden, die zu einer Reduktion der Letalität der abdominellen Sepsis führt [20]. Mit vorsichtigem Optimismus wird derzeit lediglich IL-10 betrachtet, dessen im Tierexperiment nachgewiesene antiinflammatorische Potenz man therapeutisch zu nutzen hofft [40, 45]. Allerdings mehren sich momentan die Stimmen, die hinsichtlich der Wirkung von IL-10 das Gegenteil behaupten [29, 43].

Aus diesen Gründen hat sich an der Therapie der postoperativen systemischen Infektion seit geraumer Zeit nichts Wesentliches geändert. Nach wie vor sieht sie, auf den individuellen Fall abgestimmt, einen dreiteiligen Therapieansatz vor, bestehend aus chirurgischer Sanierung,

antibiotischer Abdeckung und intensivmedizinischer Unterstützung der Organfunktionen [5, 14, 87]. Dementsprechend ist auch die Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis in den letzten 30 Jahren relativ konstant geblieben.

Um diese Tatsache in Zukunft ändern zu können, bedarf es eines umfassenden Verständnisses der pathophysiologischen Zusammenhänge der postoperativen Sepsis. Ziel der Forschung sollte es darum sein, vor allem in experimentellen Studien weitere Details herauszuarbeiten, um auf Grundlage der molekularen Vorgänge während einer polymikrobiellen Sepsis eine suffiziente Therapie derselben entwickeln zu können. Grundvoraussetzung hierfür sind Tiermodelle, die die klinische Situation von Patienten mit Anastomoseninsuffizienz und konsekutiver abdomineller Sepsis möglichst exakt imitieren. Umso mehr ein Tiermodell dazu in der Lage ist, desto eher kann man Ergebnisse aus entsprechenden Studien auf die klinische Situation beim Menschen übertragen. Zwei dieser Modelle, die häufig verwendete Cecal Ligation and Puncture (CLP) und die relativ neue Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP), werden im Rahmen der vorgelegten Arbeit vorgestellt, charakterisiert und bezüglich ihrer Eignung, abhängig von der zugrunde liegenden Fragestellung, diskutiert.

3 Wissenschaftliche Grundlagen und Fragestellung der Arbeit

3.1 Inflammation und Sepsis

Die angeborene Fähigkeit des Körpers sich zu verteidigen, basiert auf drei Elementen: mechanischen Barrieren, unspezifischer Abwehr und antigenspezifischer Immunantwort [4]. Gelingt es Pathogenen, in den Organismus einzudringen bzw. Gewebe zu verletzen, reagiert der Körper initial unspezifisch mit einer Entzündung in dem betroffenen Gebiet. Im Rahmen des entzündlichen Prozesses kommt es zu vier Hauptereignissen, nämlich Vasodilatation, erhöhter Gefäßpermeabilität, Zellaktivierung und Gerinnung. Diese lokalen hämodynamischen Veränderungen bedingen die vier klassischen Symptome der Entzündung: Rubor, Tumor, Calor und Dolor [20]. Alle diese Vorgänge werden physiologischerweise ausgelöst und aufrecht erhalten durch eine Vielzahl verschiedener Zyto- und Chemokine, die im Wesentlichen von Endothelzellen, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sezerniert werden [44, 51, 52]. Durch die Chemokine angelockt, gelangen weitere Leukozyten in das betroffene Gebiet, die ihrerseits wiederum vermehrt Zyto- und Chemokine freisetzen. Eine Reihe sekundärer Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane, NO oder Proteasen werden vom Endothel gebildet und freigesetzt. Durch den lokal erhöhten Stoffwechsel steigt gleichzeitig der Sauerstoffverbrauch der Zellen an und der pH-Wert sinkt, was zu einem bakteriziden Mikromilieu führt [78]. Aufgrund dieser Mechanismen wird die Entzündung erhalten. Zusätzlich wird durch lokale Gerinnungsaktivierung der entzündliche Fokus vom Restorganismus isoliert [20]. Wenn es im Verlauf gelungen ist, das verantwortliche Pathogen zu eliminieren bzw. das verletzte Gebiet zu sanieren, klingt die Entzündung ab, und das betroffene Gewebe „heilt“, wobei die Phase der Rehabilitation im Vergleich zum Schock eher als chronischer Prozeß anzusehen ist, der über Wochen andauern kann [44].

Allerdings verläuft die Entwicklung nicht immer so, wie oben geschildert. Ein zunächst lokaler Prozess, zum Beispiel nach einem massiven Trauma, kann außer Kontrolle geraten und durch systemische Zytokinfreisetzung in das sogenannte „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) münden. Die Effekte der Zytokine, die im Rahmen einer lokalen Infektion nützlich und wichtig sind, haben bei systemischer Wirkung fatale Folgen für den

Organismus. Durch eine generalisierte Vasodilatation sinkt der periphere Gefäßwiderstand mit daraus resultierender Hypotension. Gleichzeitig ist die Permeabilität der Gefäßwände stark erhöht, es kommt zu massivem Volumenverlust ins Interstitium. Die Kontraktilität des Myokards ist ebenfalls erniedrigt, was im Zusammenhang mit erhöhter NO-Freisetzung steht. Das Herz reagiert mit Tachykardie. In Folge dieser Ereignisse kommt es zum Schock, zur Minderdurchblutung peripherer Organe und letztendlich zum Multiorganversagen, „Multi Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS), eine Situation, die nur noch schwer zu kontrollieren ist [1, 9, 20, 71].

Wenn ein nachgewiesener Infekt den Ausgangspunkt eines SIRS darstellt, so spricht man per definitionem von einer Sepsis [12].

Die postoperative bakterielle Sepsis, meist in Folge einer Anastomoseninsuffizienz auftretend, ist in der Chirurgie nach wie vor ein großes Problem [5, 81]. Dabei geht man davon aus, dass die aus dem Darm freigesetzten Bakterien zunächst zu einer lokalisierten, dann zu einer generalisierten Bauchfellentzündung, einer Peritonitis, führen, die praktisch immer zu einer fulminanten Sepsis und somit zu den oben genannten Vorgängen führt.

3.2 Tiermodelle

Erst vor kurzem wurde wieder einmal festgestellt, dass das ideale Modell zur Erforschung der Sepsis noch nicht gefunden ist [64], obwohl man sich schon lange bemüht, ein brauchbares Modell zu etablieren: Bereits 1892 konnte Massart in Versuchstieren Abszesse produzieren, indem er offene Glaszylinder, die Bakterienkulturen enthielten, in die Bauchhöhle implantierte [35]. Seitdem wurden viele Modelle etabliert, allerdings konnten sich nur wenige davon behaupten.

3.2.1 Frühe Sepsismodelle

In diesem Abschnitt sollen exemplarisch für die Vielfalt hervorgebrachter Sepsismodelle drei Varianten kurz beschrieben werden, die freilich eher historisch zu sehen sind.

3.2.1.1 Dermaler Abszess

In diesem Modell, in den sechziger Jahren beschrieben, wird Ratten eine mit *Pseudomonas aeruginosa* beimpfte Spalthaut transplantiert, die einen dermalen Abszess hervorruft. Durch Variation der Größe der Spalthaut können dabei Klinik und Mortalität der Tiere kontrolliert

werden [48, 83]. Hier bildet also ein peripher erzeugter Abszess den Herd der Sepsis, wobei der Verlauf durch Veränderung der Spalthautgröße sicher nur grob zu beeinflussen ist.

3.2.1.2 Intramuskulärer Abszess

Ein ähnliches Prinzip liegt diesem Modell zu Grunde, welches an Hunden durchgeführt wurde. Ein mit Stuhl gefülltes Stück Nabelschnur wird in das Weichteilgewebe eines Beines implantiert. Binnen 24h zeigt das Bein eine deutliche Schwellung und Erythem, also Entzündungszeichen, und das Herz reagiert mit einem Anstieg der Auswurfraction um 20% [38, 39]. Da allerdings die Mortalität dieses Modells bei Null liegt, der Aufwand und die Belastung der Tiere aber sehr hoch sind, hat sich dieser Ansatz nicht durchgesetzt.

3.2.1.3 Ischämische Gallenblase

Ebenfalls an Hunden wurde dieses Modell etabliert, das man 1978 publizierte. Nach Präparation der Gallenblase werden Arteria cystica und Ductus cysticus ligiert. Anschließend injiziert man 10^8 E. coli/kg in die Gallenblase. Die Tiere entwickeln alle eine schwere biliäre Sepsis, auch mit entsprechender Mortalität [66]. Da auch dieses aufwendige Modell eine hohe Belastung für die großen Versuchstiere bedeutet, wird es heute kaum noch eingesetzt.

3.2.2 Injektions-/Infusionsmodelle

Diese Modelle, denen als gemeinsames Prinzip die Injektion pathogener Substanzen zu Grunde liegt, spielten und spielen eine große Rolle. Dabei gilt es verschiedene Varianten zu beachten.

3.2.2.1 Endotoxin

Die Wand gramnegativer Bakterien enthält ein Glycolipid namens Lipopolysaccharid (LPS). LPS, gemeinhin auch Endotoxin genannt, wurde Anfang der fünfziger Jahre als wichtige Ursache des gramnegativen Schocks im Menschen postuliert [13, 15]. Seitdem wurden eine Vielzahl Tierversuche unter Applikation von LPS durchgeführt. Dabei gibt es verschiedene Varianten. Bei den sogenannten Bolusmodellen wird einmalig eine bestimmte Menge LPS intravenös injiziert, wobei man durch Variation der Dosierung wahlweise ein subletales oder ein letales Modell erzeugen kann [42, 49]. Ebenfalls beschrieben ist die intraperitoneale Applikation von LPS. Dies führt bei den Tieren - wie bei intravenöser Injektion - zu klinischen Symptomen des septischen Schocks. Hierbei konnten auch einige beim Menschen typische hämodynamischen Veränderungen (Absinken des peripheren Widerstands,

gesteigertes Herzminutenvolumen, Tachykardie) beobachtet werden [31]. Um der klinischen Situation einer chronischen Sepsis, bei der meist ein Fokus kontinuierlich Bakterien freisetzt, näher zu kommen, wurden Modelle entwickelt, die mit einer fortwährenden intravenösen Infusion von LPS arbeiten [28, 46]. Verbessert wurde dies dann durch den Einsatz einer osmotischen Pumpe, mit der eine exakte Menge LPS über einen bestimmten Zeitraum appliziert werden kann. Messungen verschiedener Parameter, wie Blutdruck oder Laktat, ergaben Parallelen zum Bild der kompensierten humanen Sepsis [33].

Der Hauptvorteil der verschiedenen Varianten der LPS-Applikation ist mit Sicherheit die technische Einfachheit bei der Durchführung. LPS ist ein relativ benutzerfreundlicher Stoff, gut aufzubewahren und leicht quantifizierbar. Gleichgültig, welches Tier man verwendet, die Durchführung einer Injektion genau titrierter Mengen LPS stellt kein größeres Problem dar.

Auf der anderen Seite hat LPS auch Nachteile. Schon relativ lange ist bekannt, dass gravierende pathophysiologische Unterschiede zwischen experimentell in Tieren verursachtem Endotoxinschock und gramnegativen Schock beim Menschen bestehen [82]. Bestimmte Eigenschaften lebender Bakterien, vor allem die Fähigkeit zur lokalen Expansion unter geeigneten Bedingungen, können durch die Injektion von Zellwandbestandteilen (LPS) nicht imitiert werden. So gesehen, fehlt oben genannten Tiermodellen ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf die humane Sepsis. Entsprechend enttäuschend verliefen bisher klinische Studien, die vielversprechende Ergebnisse aus LPS-Modellen beim Menschen nachvollziehen wollten. Dazu nur ein Beispiel: Das Fusionsprotein TNFR:Fc, bei dem der p80 TNF- α -Rezeptor kovalent an den Fc-Teil von IgG gebunden ist, konnte im murinen LPS-Modell bereits nach einmaliger Gabe die Mortalität signifikant senken [56]. In der folgenden klinischen Studie bei Patienten mit septischem Schock hatte p80 TNFR:Fc jedoch keinerlei Auswirkung auf die Mortalität [34].

3.2.2.2 Bakterien

Die bereits erwähnten Argumente hinsichtlich des Unterschieds zwischen LPS und Bakterien führten zum Einsatz von lebenden Mikroorganismen. Bei diesem Sepsismodell wird dem Versuchstier eine bestimmte Menge Bakterien intravenös infundiert. Üblicherweise wird dabei das gramnegative Bakterium *Escherichia Coli* verwendet, aber auch *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* kommen zum Einsatz. Wie bei den intravenösen LPS-Modellen gibt es auch hier zwei Varianten, nämlich die des Bolus und die der kontinuierlichen Infusion.

Beim Bolus-Modell wird eine große Menge einer Bakteriensuspension quasi im Schuß intravenös appliziert [68]. Dass der Organismus mit einer plötzlichen, massiven Überflutung durch ein Pathogen überfordert ist, liegt auf der Hand. Dementsprechend kurz sind auch die Überlebenszeiten der Tiere, das Immunsystem hat keine Möglichkeit effektiv zu reagieren.

Um hier Abhilfe zu schaffen und der klinischen Situation beim Menschen näher zu kommen, entwickelte man wiederum ein Modell, bei dem über einen längeren Zeitraum gleichmäßig infundiert wird, wie zum Beispiel eine über 5 Stunden dauernde kontinuierliche Infusion von *Pseudomonas aeruginosa* bei Hunden [69, 70]. Diese Variante birgt aber das Problem, dass das Tier keine Möglichkeit hat, den septischen Fokus zu isolieren, denn eine stetig intravenös laufende Infusion ist nicht zu stoppen.

Bakterienkulturen so aufzubereiten und zu quantifizieren, dass man sie für standardisierbare Infusionsmodelle verwenden kann, ist ungleich aufwendiger als die entsprechende Bearbeitung von LPS [32] und somit ein Nachteil dieses Verfahrens. Auf der anderen Seite ist es von Vorteil, Bakterienkulturen zu verwenden, da man damit dem Bild der humanen Sepsis näher kommt als mit LPS-Infusionen.

In zahlreichen Studien, die das Bakterien-Infusionsmodell einsetzten, veränderten sich klinische Parameter der septischen Tiere analog zum septischen Menschen, wie geringer peripherer Widerstand [18], verminderte GFR [76] oder arterielle Hypoxämie [36]. Allerdings wurden bisweilen unterschiedliche Ergebnisse zwischen Bolus- und chronischen Modellen beobachtet. So wurde bei einem mit *E.coli* durchgeführten Bolus in Ratten ($1,5 \times 10^{10}$ Bakterien/kg) ein über 90 Minuten erhöhter Auswurf des Herzens gemessen, ehe er wieder auf normale Werte sinkt [75]. Dagegen ist der gleiche Parameter bei chronischer *E.coli*-Infusion über 5 Stunden ($8-18 \times 10^9$ Bakterien pro Stunde, ungefähre Gesamtdosis $1-3 \times 10^{10}$ Bakterien/kg) in Ratten initial unverändert, ehe er nach 3-4 h sogar signifikant absinkt [65].

Weiterhin gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der verwendeten Bakterienspezies. Während mit *Staphylococcus aureus* behandelte Schweine wenig Veränderungen zeigen, entwickeln mit *E.coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* infundierte Schweine einen Schock und ein akutes Atemnotsyndrom [22].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bakterielle Infusionsmodelle sicherlich bei vielen Fragestellungen den Endotoxinmodellen überlegen, allerdings hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die humane polymikrobielle Sepsis kritisch zu betrachten sind.

3.2.3 Peritonitismodelle

Aufgrund des Scheiterns der Therapiestrategien, die aus Bolusschockmodellen entwickelt wurden, forderte man Tiermodelle, die dem klinischen Bild einer Peritonitis mit daraus resultierender Sepsis näher kommen. Vor allem von chirurgischer Seite wurden Tiermodelle in diese Richtung entwickelt. Zunächst löste man durch Injektion von Bakterienkulturen in die Bauchhöhle eine Peritonitis aus [67, 77], wobei in der Zusammensetzung der Kulturen verschiedene Varianten untersucht wurden [16, 21].

Entscheidend aus chirurgischer Sicht sind jedoch Modelle, bei denen die Bauchhöhle und das Intestinum operativ manipuliert werden, da man mit der Simulation im Tiermodell der Realität möglichst nahe kommen will.

3.2.3.1 Implantate

Dieser Ansatz verfolgt die chirurgische Implantation eines mit Pathogenen gefüllten Behälters in die Bauchhöhle eines Versuchstieres.

Eine Möglichkeit ist dabei der Einsatz einer Gelatinekapsel [62, 85]. Bei dieser Variante wird Ratten operativ eine mit Faeces und Bariumsulfat gefüllte Kapsel in das Peritoneum eingepflanzt. Das Bariumsulfat wird zugegeben, um die Toxizität der Faeces zu verstärken. Die Kapsel löst sich nach einer gewissen Zeit auf und setzt ihren Inhalt in die Bauchhöhle frei. Dies führt binnen drei Tagen nach Operation zum Tod der meisten Tiere durch generalisierte Peritonitis, wie Obduktionen verdeutlichen. In der Folge wurde dieses Modell noch weiterentwickelt, indem man die Faeces der Ratte durch genau abgemessene Kulturen verschiedener Bakterien der Darmflora ersetzte. Das Modell führt zu klinischen Zeichen einer Peritonitis, E. coli-Bakteriämie und hoher Mortalität [7, 63].

In einen bovinen Fibrinklumpen eingebrachte E. coli Bakterien dienen bei einem ähnlichen Modell als Pathogen. Dieser Fibrinklumpen wird Hunden in die Bauchhöhle implantiert, was eine Mortalität von 90 Prozent binnen 10 Tagen zur Folge hat. Im Gegensatz dazu sterben 100 Prozent aller Tiere in den ersten 24 Stunden, wenn die gleiche Menge E. coli in Form einer Suspension direkt ins Peritoneum injiziert wird [2]. Dieses „Fibrinklumpen-Modell“ erfuhr noch eine Reihe von kleinen Variationen, wie zum Beispiel das zusätzliche Einbringen von perkutanen Kathetern in die Bauchhöhle, um ein optimales Monitoring des Geschehens betreiben zu können [59]. Insgesamt können bei diesem Modell klinische Zeichen der systemischen Infektion wie erhöhtes Schlagvolumen oder Leukozytose beobachtet werden [30, 60].

Erwähnenswert ist auch noch eine Variante, die bei Ratten etabliert wurde, nämlich die Implantation einer mit Faeces, Agar und einer bestimmten Menge *E. coli*/*Bacteroides fragilis* gefüllten Pille in das Peritoneum, ein Modell, das mit ähnlichen Ergebnissen wie die oben genannten aufwarten kann [58].

Allen beschriebenen Varianten ist gemein, dass das Pathogen, sei es nun Faeces oder eine Bakterienkultur, in einer Hülle in die Bauchhöhle eingebracht wird. Das heißt, unmittelbar nach der Operation bleiben die Keime zunächst isoliert, ehe sich die Kapselwand auflöst und die Erreger ins Peritoneum freigesetzt werden. Von da ab kommt es zu einem kurzen, heftigen und zumeist letalen Verlauf. Dabei ist der Zeitpunkt dieses Ereignisses schwer vorherzusagen bzw. zu beeinflussen.

Letztendlich ist der ins Peritoneum eingebrachte Behälter als intraabdomineller Abszeß, also als eine abgekapselte Ansammlung von Bakterien, zu sehen. Dieser Abszeß rupturiert früher oder später und setzt seinen tödlichen Inhalt frei. Dementsprechend kann man diese Variante eines Peritonitismodells treffender als Abszessmodell bezeichnen.

3.2.3.2 Zökumligatur-Modelle

Die Entwickler dieser Modelle verfolgten das Ziel, durch eine operative Ligatur des Zökums einen septischen Fokus zu schaffen. Um den gastrointestinalen Fluss nicht zu unterbrechen, setzt man die Ligatur unterhalb der ileozoekalen Klappe. Erstmals beschrieben wurde dieses Modell 1968 von Clowes et al., der die Zökumligatur bei Hunden durchführte [19]. Die Tiere entwickeln im Verlauf Fieber und eine respiratorische Alkalose. Nachdem Blutdruck und kardialer Auswurf zunächst mäßig sinken, steigen diese Parameter ab dem 2. postoperativen Tag an.

Das Modell der zökalen Ligatur wurde in der Folge bei Hunden reproduziert [88] sowie auf Schweine [41] und Ratten [74] übertragen. Übereinstimmend wurde die Pathophysiologie dieses Modells in etwa wie folgt erklärt: Durch die Ligatur wird die komplette Blutversorgung des distalen Zökums unterbunden, worauf dieses nekrotisch wird und den Austritt von Stuhl und Bakterien in die Bauchhöhle zulässt. Die freigesetzten Keime sorgen dann für die beobachtete Peritonitis.

3.2.3.3 Cecal Ligation and Puncture (CLP)

Der us-amerikanische Chirurg Keith A. Wichterman publizierte 1980 seine Studien zum Sepsismodell der zökalen Ligatur mit anschließender Punktion [86]. Sein erklärtes Ziel war es dabei, ein Sepsismodell zu schaffen, das vor allem einfach sein sollte, dessen Ergebnisse

gut reproduzierbar sein und durch große Gruppenzahlen statistische Signifikanz erreichen sollten. Um eine wichtige Voraussetzung für die Erfüllung dieser Kriterien zu schaffen, legte er sich von vornherein bei der Wahl der Tierart auf Ratten fest. Kleine Nagetiere seien relativ billig, überall in großen Stückzahlen zu erwerben, genetisch identisch, gleichen Alters und Geschlechts, auf der gleichen Diät und frei von spezifischen Pathogenen.

Wichterman versuchte sich zunächst an dem oben beschriebenen Modell der zökalen Ligatur. Dazu operierte er 71 männliche Albino-Holtzmann-Ratten, wobei es ihm bei keinem einzigen der Tiere gelang, mit diesem Verfahren eine Peritonitis auszulösen. Stattdessen bildete sich ein lokalisierter intraabdomineller Abszess, den die Ratten gut tolerierten. Auch sonst waren die Tiere postoperativ unauffällig und überlebten ohne Probleme einen Zeitraum von 4 Wochen, ehe sie geopfert wurden. Ein Teil der Tiere wurde nach 7 Tagen geopfert, und Blutkulturen wurden genommen. Diese fielen allesamt negativ aus.

Aufgrund der nicht vorhandenen Mortalität und der negativen Blutkulturen kam man zu dem Schluss, dass die Tiere nach einer zökalen Ligatur nicht septisch werden und schon gar nicht in einen septischen Schock geraten, und ging dazu über, das Zökum nach erfolgter Ligatur mit einem Venenverweilkatheter zu punktieren (die genaue Operationstechnik ist unter Punkt 4.1.3.1 nachzulesen). Dadurch sollte ein mit der Punktion beginnender, kontinuierlich andauernder Fluss von Bakterien in die Bauchhöhle gewährleistet werden.

Im Folgenden wurde die CLP von Wichterman et al. hinsichtlich Mortalität, Blutkultur und Peritonitisparametern evaluiert. Zunächst zeigten die meisten Tiere, beginnend 12 Stunden nach CLP, klinische Auffälligkeiten wie Lethargie, aufgestelltes Fell, eingeschränkte Bewegung, weißliches Exsudat der Augen usw., ehe sie sich ohne Gegenwehr auf den Rücken drehen ließen, was den baldigen Exitus letalis bedeutete. Geringfügige Unterschiede in der Mortalität ergaben sich dabei abhängig von der Anzahl der Punktionen und dem Durchmesser der verwendeten Kanülen: 77% (22G-Kanüle, einfache Punktion) bis 94% (18G-Kanüle, zweifache Punktion). Die Obduktion erwies jeweils eine generalisierte Peritonitis, Blut- und Peritonealkulturen waren positiv und enthielten *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* und *Bacteroides fragilis*. Damit sahen Wichterman et al. wichtige Anforderungen an ein Sepsismodell erfüllt.

Seit der Erstpublikation 1980 wird die CLP weltweit bei zahlreichen Studien zur Erforschung der Pathogenese von Sepsis und septischem Schock eingesetzt. Sowohl physiologische Parameter als auch immunologische Grundlagen wurden evaluiert [17, 37, 43, 55]. Das Modell wurde außerdem auf Mäuse [3] und Schafe [73] übertragen.

3.2.3.4 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Die CASP wurde von Niko Zantl im Rahmen einer chirurgisch-mikrobiologischen Kooperation erarbeitet und 1997 erstmals publiziert. Ziel der Studien war es, ein Tiermodell in der Maus für die postoperative abdominale Sepsis zu entwickeln, um damit die immunologische Pathophysiologie während des Verlaufs einer Sepsis analysieren zu können [89].

Vor dem Hintergrund der bereits oben erwähnten Enttäuschungen bei klinischen Studien mit in Injektions- und Infusionsmodellen erfolgreich getesteten Substanzen sollte das neue Modell der generalisierten Peritonitis beim chirurgischen Patienten möglichst nahe kommen. Dazu wird den Mäusen während einer kurzen Operation ein Stent in das Colon Ascendens implantiert, der eine physikalische Verbindung zwischen Darmlumen und Peritoneum herstellt (die genaue Operationstechnik ist unter Punkt 4.1.3.2 nachzulesen). Diese Verbindung stellt nun einen septischen Fokus dar, der kontinuierlich Bakterien in die Bauchhöhle aussät. Durch Variation des Durchmessers bei den verwendeten Stents kann auf die Mortalität der CASP Einfluss genommen werden. So beschreibt Zantl bei Mäusen nach 14G-CASP eine Mortalität von 100%, nach 18G-CASP von 64% und nach 22G-CASP von 38% binnen 48 Stunden nach OP [90].

Da die chirurgische Fokussanierung ein wichtiger Bestandteil der Therapie bei Peritonitis ist, wurde als Erweiterung zu diesem Sepsismodell die CASP mit chirurgischer Intervention, kurz CASPI, etabliert. Dabei wird nach vorausgegangener 14G-CASP der Stent entfernt und der Defekt der Darmwand übernäht. Anschliessend erfolgt eine intensive Peritoneallavage mit 5ml steriler Kochsalzlösung. Zantl führte die CASPI jeweils 3h, 5h und 9h nach 14G-CASP durch und fand dabei ein Überleben von 100% (3h), 35%(5h) und 0%(9h). Dementsprechend schloss er, dass zwischen 3 und 9 Stunden nach Sepsisinduktion entscheidende Mechanismen in Gang gesetzt werden, die sich unabhängig vom sanierten Fokus weiterentwickeln. Nach 9 Stunden ist der „point of no return“ überschritten, von da ab kann kein Tier mehr allein durch chirurgische Intervention gerettet werden [90].

Bakteriologische, histologische und serologische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die CASP zu charakterisieren. Zwischen 3 und 12 Stunden nach 14G-CASP steigt die Zahl der Bakterien im Peritoneum exponentiell an, ehe ein Plateau erreicht wird. In Blut, Leber, Lunge und Milz können 12 Stunden nach OP größere Bakterienzahlen nachgewiesen werden. Histologische Schnitte der Colonwand zeigen 12h nach 14G-CASP erhebliche Infiltrationen durch Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen. LPS- und TNF α -Konzentrationen im Blut bzw. Serum von Mäusen wurden 3, 6, 12 und 24 Stunden nach 14G-CASP gemessen und

ergaben jeweils bis 12 Stunden stetig ansteigende Werte, die bis 24 Stunden nach OP in etwa konstant bleiben. Die Kontrollgruppen wurden der sogenannten sham-OP unterzogen, eine Technik, bei der der Stent außen am Darm ohne Punktion angenäht wird [90].

Trotz dieser Daten sowie in der Folge mit der CASP angefertigter Studien über IL-10 [29] und zur Chemokinexpression nach Peritonitis in Lunge [61] und Niere [53] hat sich die CASP in der internationalen Sepsisforschung bisher nicht durchsetzen können.

3.3 Fragestellung der Arbeit

Das in der Forschung weitverbreitete Modell zur operativen Erzeugung einer Peritonitis in der Maus, die Cecal Ligation and Puncture (CLP), soll mit dem neueren Verfahren der Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) verglichen werden. Dabei sollen Vor- und Nachteile des jeweiligen Modells herausgearbeitet und gegeneinander abgewogen werden.

Dazu wurden unbehandelte Mäuse der CLP bzw. der CASP unterzogen, ausserdem wurde als Kontrolle eine Sham-Gruppe operiert. Zunächst wurden dabei die klinische Auswirkung und die Letalität des jeweiligen Modells und dessen spezifischer Varianten beleuchtet. Im zweiten Teil der Arbeit wurden CASP und CLP anhand *ex vivo* durchgeführter Analysen verglichen. Dazu wurden drei histologische Färbungen von proximalem Jejunum, Bakteriologien von Peritoneallavage, Blut, Leber, Milz, Nieren und Lunge angefertigt, sowie die Serumspiegel verschiedener Zytokine mittels ELISA gemessen.

4 Material und Methodik

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen gemacht:

- **Cecal Ligation and Puncture (CLP)**
 - Überlebenskinetik nach 18G-CLP mit einfacher Punktion (CLP(1)) und nach 18G-CLP mit zweifacher Punktion (CLP(2))
 - Fotografie des Situs 24h nach CLP(1) und CLP(2)
 - HE- und Immunhistologie des Jejunums 6h, 12h und 18h nach CLP(1) und CLP(2)
 - Bakterienzahl in Peritoneallavage, Blut, Leber, Milz, Nieren und Lunge 6h, 12h und 18h nach CLP(1) und CLP(2)
 - Serumspiegel von IL-1 β , IL-10 und TNF- α 6h, 12h, 18h und 24h nach CLP(1) und CLP(2)
- **Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)**
 - Überlebenskinetik nach 14G-, 16G- und 18G-CASP
 - Fotografie des Situs 24h nach 14G-CASP
 - HE- und Immunhistologie des Jejunums 6h, 12h und 18h nach 14G-CASP
 - Bakterienzahl in Peritoneallavage, Blut, Leber, Milz, Nieren und Lunge 6h, 12h und 18h nach 14G-CASP und 16G-CASP
 - Serumspiegel von IL-1 β , IL-10 und TNF- α 6h, 12h und 18h nach 14G-CASP und 16G-CASP

4.1 Methodik in vivo

4.1.1 Genehmigung der Tierversuche

Gemäß Tierschutzgesetz waren die Tierversuche zuvor von der zuständigen Behörde, in diesem Fall der Regierung von Oberbayern, unter dem Aktenzeichen 211-2531-57/95 (Erweiterungsantrag) genehmigt worden.

4.1.2 Tiere und Tierhaltung

Verwendet wurden von Harlan-Winkelmann (Harlan-Winkelmann GmbH, Gartenstr. 27, 33178 Borcheln, Deutschland) bezogene, ingezüchtete weibliche C57Bl/6 -Mäuse im Alter von 8-10 Wochen, die ein Gewicht von 20-25 g aufwiesen.

Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) mit je 5 bzw. 10 Mäusen pro Käfig auf Einstreu bei Pressfutter (Altromin 1324 Standard-Diät, Lage, Deutschland) sowie Wasser ad libitum im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München, Klinikum Rechts der Isar, gehalten.

Bei jedem Versuch wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen Versuchsgruppen vor Beginn des Experiments eine Woche unter gleichen Bedingungen in einem Stall zugebracht hatten.

Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierversuchsordnung durchgeführt.

4.1.3 Tiermodelle

In dieser Arbeit werden zwei operative Speziesmodelle, die CASP und die CLP, unter Beleuchtung verschiedener Gesichtspunkte miteinander verglichen. Beiden Modellen gemein ist der chirurgische Hintergrund, vor dem sie entwickelt und etabliert wurden. Dennoch gibt es wichtige Unterschiede bei der Operation.

4.1.3.1 Die Cecal Ligation and Puncture (CLP)

Bei der CLP wird das Zökum unterhalb der Mündung des terminalen Ileums in das Colon Ascendens ligiert und anschliessend punktiert. Dadurch soll eine kontinuierliche Freisetzung von Bakterien aus dem Darm in das Peritoneum sichergestellt werden, die die fatale Kaskade in Gang setzt und aufrecht erhält.

In vorliegender Arbeit wurde die Punktion mit Venenverweilkathetern vom Durchmesser 18G durchgeführt. Dabei wurde die CLP einmal mit einfacher, einmal mit doppelter Punktion operiert, entsprechend dem subletalen und dem letalen Modell Wichtermans.

4.1.3.1.1 Anästhesie

Zur Vorbereitung der Narkose wird der Boden eines Glaskolbens (Volumen: ca. 1 Liter) mit mehreren Lagen Zellstoff ausgekleidet, die mit Diethylether befeuchtet werden. Außerdem wird ein Zentrifugenröhrchen (Volumen: 15 ml) mit Kompressen ausgestopft und vollständig mit Diethylether durchtränkt. Nun wird das Versuchstier in den Glaskolben, der luftdicht mit einem Deckel verschlossen ist, gesetzt. Sobald die Maus vollständig betäubt ist, wird sie aus

dem Glaskolben herausgeholt und rücklings auf eine Korkplatte gelegt, wo sie mittels vierer Klebestreifen an den Vorder- und Hinterläufen fixiert wird. Dabei wird das Zentrifugenröhrchen so angeordnet, dass sich die Nase des Tieres unmittelbar an der Öffnung desselben befindet. Durch Verschieben des Röhrchens kann die Narkose nun sehr einfach gesteuert werden.

Nach der Operation entfernt man das Röhrchen und das Tier erwacht binnen 5 Minuten, weitere 5 Minuten später bewegt es sich wieder normal und unauffällig im Käfig.

4.1.3.1.2 Operationstechnik

4.1.3.1.2.1 Instrumentarium

Es werden folgende Instrumente verwendet:

- Mikrochirurgisches Besteck mit Mikronadelhalter, Pinzette, Mikroschere
- Nadelhalter
- Schere
- Wattestäbchen
- Venenverweilkatheter (Venflon™; 18GA; 1,2x45mm; 80ml/min)
- 5/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 5/0; Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)
- 7/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 7/0; Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)

4.1.3.1.2.2 Operation

Nach gründlicher Desinfektion der Haut mit Cutasept (Cutasept ® F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) wird diese mit einer anatomischen Pinzette leicht angehoben und mit der Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm längs inzidiert. Analog dazu wird die Bauchmuskelfaszie entlang der Linea alba durchtrennt.



Abb. 1a: Inzision der Bauchhaut



Abb. 1b: Bauchmuskel durchtrennt

Mit zwei Wattestäbchen wird nun der Zökalpol aufgesucht und das Zökum vorsichtig herausluxiert.



Abb. 1c: Aufsuchen des Zökalpols



Abb. 1d: Herausluxieren des Zökums

Anschliessend wird das Zökum unterhalb der Mündung des Ileums mit Ethilon 5/0 ligiert, ohne den Faden dabei zu fest zu ziehen, so dass das Zökum vom distalen Ende aus betrachtet jetzt auf einer Länge von ca. 1,5 cm abgebunden ist.



Abb. 1e: Ligatur mit Ethilon 5/0



Abb. 1f: Ligiertes Zökum

Mit der 18G-Kanüle wird jetzt die antimesenteriale Seite des ligierten Zökums ein- oder zweimal punktiert, so dass Faeces austreten kann.



Abb. 1g: 18G-Kanüle



Abb. 1h: Punktion des Zökums



Abb. 1i: 2. Punktion



Abb. 1j: Zweifach punktiertes Zökum

Nun werden die ausgeschwenkten Darmanteile in die Bauchhöhle reponiert, 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert und Peritoneum, Muskulatur und Faszien mit 5/0 Ethilon fortlaufend verschlossen. Die Hautnaht erfolgt durch Einzelknöpfe ebenfalls mit 5/0 Ethilon.



Abb. 1k: Reposition des Zökums



Abb. 1l: Applikation von 0,5 ml NaCl



Abb. 1m: Verschluss des Bauchmuskels

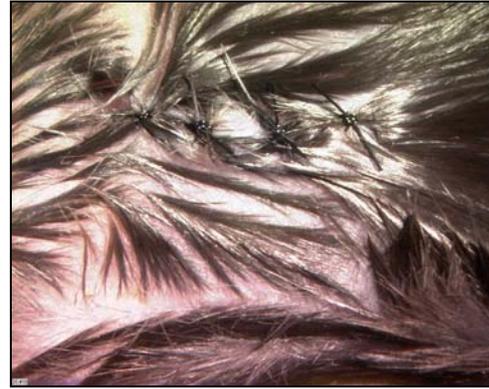


Abb. 1n: Hautnaht

4.1.3.2 Die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Bei der CASP wird mit dem Einbau eines Stents in das Colon ascendens von Mäusen eine Verbindung vom Darmlumen in das Peritoneum geschaffen, was einen kontinuierlichen Austritt von Bakterien in die Bauchhöhle gewährleistet. Durch die Wahl der Stentgröße (14G, 16G, 18G) kann auf die Letalität des Modells Einfluss genommen werden.

4.1.3.2.1 Anästhesie

Die Narkose wird, wie unter 4.1.3.1.1 beschrieben, durchgeführt.

4.1.3.1.2 Operationstechnik

4.1.3.1.2.1 Instrumentarium

Es werden folgende Instrumente verwendet:

- Mikrochirurgisches Besteck mit Mikronadelhalter, Pinzette, Mikroschere
- Nadelhalter
- Schere
- Wattestäbchen
- Venenverweilkatheter mit verschiedenen Durchmessern:
 - Venflon™; 18GA; 1,2x45mm; 80ml/min
 - Venflon™; 16GA; 1,7x45mm; 180ml/min
 - Venflon™; 14GA; 2,0x45mm; 270ml/min
- 5/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 5/0; Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)
- 7/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 7/0; Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)

4.1.3.1.2.2 Operation

Der Venenverweilkatheter wird mit einer Schere 2 mm nach Beginn der Plastikummantelung zirkulär eingeritzt.

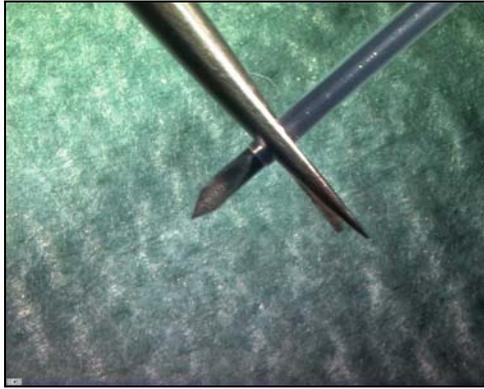


Abb. 2a: Einritzen des Plastikmantels



Abb. 2b: Katheter mit Kerbe

Nach gründlicher Desinfektion der Haut mit Cutasept (Cutasept ® F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) wird diese mit einer anatomischen Pinzette leicht angehoben und mit der Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm längs inzidiert. Analog dazu wird die Bauchmuskelfaszie entlang der Linea alba durchtrennt.



Abb. 2c: Inzision der Haut

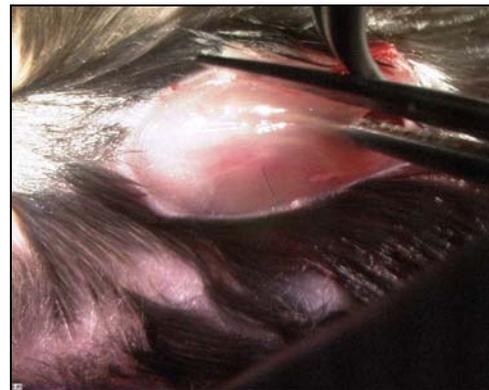


Abb. 2d: Durchtrennen der Linea alba

Der Zökalpol wird mittels zweier Wattestäbchen aufgesucht und Zökum, terminales Ileum und Colon ascendens werden vorsichtig herausluxiert. Ca. 1,5 cm oberhalb der Mündung des Ileums wird das Colon ascendens antimesenterial mit Ethilon 7/0 tangential durchstochen.



Abb. 2e: Freilegen des Zökums



Abb. 2f: Herausluxieren des C. ascendens



Abb. 2g: Durchstich mit 7/0



Abb. 2h: Chirurgischer Knoten

Mit dem vorbereiteten Verweilkatheter erfolgt die Punktion des Colons unmittelbar oral der vorgelegten Naht. Der Katheter wird anschliessend vorsichtig vorwärts geschoben, bis sich die Kerbe des Plastikmantels auf Höhe der Serosa befindet.



Abb. 2i: Punktion des Colons



Abb. 2j: vorgeschobener Katheter

Mit den freien Enden des Fixierungsfadens wird der Katheter nun umschlungen und durch einen chirurgischen Knoten auf die Kerbe gesichert. Hierauf wird der Katheter auf der gegenüberliegenden Seite mit 1-2 Stichen durch die Darmwand weiter fixiert.



Abb. 2k: Chir. Knoten auf die Kerbe



Abb. 2l: Katheter, einfach fixiert



Abb. 2m: Durchstechung der Darmwand

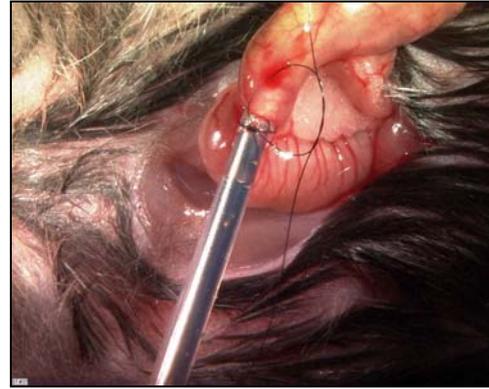


Abb. 2n: Chir. Knoten



Abb. 2o: Katheter, zweifach fixiert



Abb. 2p: Abschneiden der Fäden

Die Nadel wird entfernt und der Katheter ca. 1mm über der Serosa abgeschnitten.



Abb. 2q: Zurückziehen der Nadel



Abb. 2r: Abschneiden des Katheters

Durch vorsichtigen Druck auf das Zökum füllt man den Stent mit Faeces, ehe sämtliche ausgeschwenkten Darmanteile in die Bauchhöhle reponiert werden.



Abb. 2s: Stent, mit Faeces gefüllt



Abb. 2t: Reposition in die Bauchhöhle

Es erfolgt die Applikation von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p.. Zum Wundverschluss werden Peritoneum, Muskulatur und Faszien mit 5/0 Ethilon fortlaufend verschlossen. Die Hautnaht erfolgt durch Einzelknöpfe ebenfalls mit 5/0 Ethilon.



Abb. 2u: Applikation von 0,5 ml NaCl



Abb. 2v: Naht des Bauchmuskels



Abb. 2w: Hautnaht

4.1.3.3 Die Kontroll-Operation (Sham)

Als Kontroll-Operation, im Folgenden Sham-OP genannt, musste ein Modell gewählt werden, das sowohl der CLP, als auch der CASP als Kontrolle dienen konnte. Am ehesten schien dazu eine einfache Laparotomie mit Applikation von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung und Wundverschluss geeignet.

4.1.3.3.1 Anästhesie

Die Narkose wird, wie unter 4.1.3.1.1 beschrieben, durchgeführt.

4.1.3.3.2 Operationstechnik

Nach gründlicher Desinfektion der Haut mit Cutasept (Cutasept ® F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) wird diese mit einer anatomischen Pinzette leicht angehoben und mit der Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm längs inzidiert. Analog dazu wird die Bauchmuskelfaszie entlang der Linea alba durchtrennt. Es werden 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Bauchhöhle gespritzt. Peritoneum, Muskulatur und Faszien werden anschliessend mit 5/0 Ethilon fortlaufend verschlossen. Die Hautnaht erfolgt durch Einzelknöpfe ebenfalls mit 5/0 Ethilon.

4.1.3.4 Postoperative Überwachung und Behandlung

4.1.3.4.1 Schmerztherapie

Alle Mäuse erhielten postoperativ eine Schmerztherapie mit Buprenorphin 0,1 mg/kg/die i.m..

4.1.3.4.1 Monitoring

Die postoperative Überwachung der Mäuse wurde wie folgt durchgeführt. Die Tiere wurden alle 6 Stunden kontrolliert und einer standardisierten Untersuchung zugeführt. In dieses Schema gehen Körpergewicht, äußere Erscheinung, Atmung, spontanes und provoziertes Verhalten, sowie Reaktion auf Reize ein. Jedes dieser Kriterien wird, steigender Belastung entsprechend, auf einer Scala von 0-3 Punkten bewertet. Beim Erreichen von 3 Punkten bei mindestens zwei Parametern, werden alle mit 3 Punkten belegten Befunde mit 4 Punkten bewertet. Damit kommt man der Tatsache entgegen, dass sich die Belastungen des Versuchstiers nicht linear addieren, sondern ein Kriterium, mit 3 Punkten dokumentiert, wesentlich schwerer wiegt als drei Parameter, die mit jeweils einem Punkt versehen sind.

Abschließend werden alle erhobenen Punktwerte addiert und daraus die Belastung der Maus ermittelt. Erreicht ein Tier dabei 12 oder mehr Punkte, hat die Belastung des Tieres per definitionem bereits ein erhebliches Ausmaß erreicht, demzufolge die Maus als nicht überlebensfähig eingestuft und schmerzlos geopfert wird.

4.1.4 Überlebenskinetik

Das Modell der CASP wurde mit der CLP im Rahmen einer Überlebenskinetik verglichen. Dabei wurden ausschließlich C57Bl/6-Mäuse, wie oben beschrieben, operiert. Die CASP wurde mit den Stentgrößen 14G, 16G und 18G, die CLP mit einfacher bzw. zweifacher 18G-Punktion durchgeführt. Als Kontrolle diente eine der Sham-OP unterzogene Gruppe.

Postoperativ bestand eine engmaschige Überwachung der Tiere, ihr klinischer Zustand wurde dem 12 Punkte-Schema entsprechend beurteilt. Erreichte ein Tier einen erheblichen Belastungsgrad, wurde es schmerzfrei geopfert. Insgesamt saßen die Tiere postoperativ 216 Stunden (9 Tage) unter Beobachtung, ehe sie schmerzlos geopfert wurden.

Die Ergebnisse der Überlebenskurven beziehen sich auf das Überleben bei mittlerer Belastung.

4.1.5 Fotografien

Zur Dokumentation der Operationstechnik bei CASP und CLP wurde jeweils eine C57Bl/6-Maus der entsprechenden OP unterzogen und die einzelnen Operationsschritte fotografiert. Nach der Operation wurden die Tiere schmerzfrei geopfert.

Für die Situsbilder 24 Stunden postoperativ wurde repräsentativ für sämtliche im Rahmen vorliegender Arbeit erhobenen Situsbefunde je eine Maus mit einer 14G-CASP und eine mit 18G-CLP(2) operiert. Am nächsten Tag erfolgte die Relaparatomie in Narkose (s. 4.1.3.1.1) und die fotografische Dokumentation des Befundes. Danach wurden sie schmerzfrei getötet.

Alle Aufnahmen wurden mit einem Leica™ APO Stereomikroskop gemacht und sofort digital verarbeitet.

4.1.6 Organentnahmen

Das Versuchstier wurde analog 4.1.3.1.1 in Narkose versetzt und, auf dem Rücken liegend, an den Vorder- und Hinterläufen mit Klebeband auf einer Korkplatte fixiert. Nach sorgfältiger Desinfektion mit Cutasept wurde die Operationsnaht der Haut mit einer Schere vorsichtig eröffnet. Zur Gewinnung der Peritoneallavage für die Bakteriologie wurden mit einer Spritze 6 ml steriler PBS-Lösung in die Bauchhöhle injiziert, wovon anschließend 4 ml wieder aspiriert und auf Eis gelegt wurden. Hierauf wurde der Bauchmuskel entlang der alten Naht bis zum Sternum durchtrennt. Kranial der Leber wurde die Pleura vorsichtig inzidiert und

anschließend zwei seitliche Thorakotomien durchgeführt, so dass der Brustkorb komplett eröffnet war. Es folgte die Blutabnahme durch Punktion der linken Herzkammer mit einer heparinisierten Spritze. Ein Teil des Blutes wurde zur bakteriologischen Aufbereitung in ein Eppendorf-Cup, der andere zur Bestimmung der Serumzytokine in ein Serumseparationsröhrchen (Microtainer® Brand; Becton Dickinson & Co, New Jersey, USA) gespritzt. Beide Behälter wurden auf Eis gelegt.

Für bakteriologische Untersuchungen wurden die Organe wie folgt explantiert. Die Lunge wurde via Punktion der rechten Herzkammer mit 10 ml steriler PBS-Lösung perfundiert, nach Durchtrennen der Hilusstrukturen entnommen und in ein mit 4 ml steriler PBS-Lösung gefülltes Zentrifugenröhrchen (15 ml) verbracht, das auf Eis gelegt wurde.

Die Abdominalexplantation erstreckte sich in dieser Reihenfolge auf Leber, Milz und Nieren. Alle Organe wurden ebenfalls sauber freipräpariert, entnommen und gelangten analog der Lunge zur kurzfristigen Aufbewahrung.

Zur histologischen Aufbereitung wurde zuletzt proximales Jejunum gewonnen. Dazu wurde ein ca. 5 cm langes Stück proximal am Übergang von Duodenum ins Jejunum und distal abgesetzt, das dann, schneckenförmig aufgerollt, in ein mit Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Netherlands) gefülltes Plastikschälchen einlegt wurde. Dieses wurde schockgefroren, indem es für ca. 10 Sekunden in einen mit Isomethylbutan gefüllten Behälter, der seinerseits durch flüssigen Stickstoff gekühlt war, eingetaucht wurde.

4.2 Methodik ex vivo

4.2.1 Histologische Arbeiten

4.2.1.1 Anfertigen von histologischen Gefrierschnittpräparaten

Die schockgefrorenen Jejunum-Blöcke wurden zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung der Schnitte wurden die Blöcke bei einer Kammertemperatur von -22°C im Kryostat (Leitz KG, München) auf dem Schneidetisch mittels Tissue-Tek® fixiert. Dort wurden Schnitte in einer Dicke von 7-8 μm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht, ca. 20 Minuten im Acetonbad fixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

4.2.1.2 Färbungen

Die Gefrierschnitte des Jejunums wurden sowohl nach HE als auch immunhistochemisch gefärbt. In die Untersuchung gingen Därme von Sham-, CLP(1)-, CLP(2)- und CASP-operierten Mäusen ein.

4.2.1.2.1 HE-Färbung

Zur Durchführung der HE-Färbung wurde ein Teil der Schnitte ins Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar, München, gegeben, wo sie gefärbt wurden.

4.2.1.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Hierzu wurden monoklonale Antikörper verwendet, die, nach Bindung an ihr jeweiliges Epitop und nach den verschiedenen Auswasch- und Reinigungsschritten, mit der Peroxidase/Antiperoxidase-Methode gefärbt wurden.

Dabei kamen folgende Antikörper zum Einsatz:

- a) Mac-1 (Ratte-anti-Maus mAb, Hybridom, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)
- b) Gr-1 (Ratte-anti-Maus mAb, Hybridom, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)

Bei der Gegenfärbung wurde ein mit Peroxidase konjugiertes F(ab')₂ Fragment Maus-anti-Ratte IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, INC) verwendet.

4.2.1.2.2.1 Lösungen und Puffer

Folgende Reagenzien wurden bei der Färbung verwendet:

- Phosphat buffered Saline (PBS)
- Fetales Kälberserum (FKS), 5% in PBS
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂), 0,1% in PBS
- Primärantikörper (s.o.)
- Sekundärantikörper (s.o.)
- Farbsubstrat

Lösungen:

- 0,2 M Essigsäure (11,49 ml Eisessig; H₂O ad 1,0 l)
- 0,2 M Natrium-Acetat (27,22g Na-Acetat*3 H₂O; H₂O ad 1,0l)
- 50 mM Acetatpuffer pH 5,2 (14,8 ml 0,2 M Essigsäure + 35,2 ml 0,2 M Na-Acetat ; H₂O ad 150 ml)
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung (AEC)
- 30% H₂O₂

Erstellung:

- **150 ml** 50 mM Acetatpuffer pH 5,2
 - **10 ml** AEC-Lösung
 - **30 µl** 30% H₂O₂
 - Mischen
- Aqua destillata
 - Hämalaun
 - Glyceringelatine (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA)

4.2.1.2.2.2 Durchführung

Nach Entnahme aus dem -20°C -Gefrierschrank wurden die Schnitte ca. 20-30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um eine Ablösung der Organe während der Prozedur zu vermeiden, wurden diese auf dem Objektträger mit einem Fettstift umfahren. Es folgte der erste Waschschrift durch Stellen der Objektträger in PBS für 5 Minuten. Um zu vermeiden, dass der Primärantikörper unspezifisch mit dem Fc-Anteil an verschiedene Zellen bindet, wurden sämtliche Organe für 20 Minuten mit 5% FKS geblockt. Die darin enthaltenen Antikörper blocken diese Bindungsstellen und verhindern so eine falsch positive Anfärbung der Zelle. Nach zweimaligem kurzen Waschen in PBS erfolgte das Quenchen mit 0,1% H₂O₂, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren, da diese später das Ergebnis der Färbung beeinflussen würde. Nach dreimaligem kurzen Waschen in PBS wurde für 45 Minuten der Primärantikörper (Gr-1, 1:50 in PBS verdünnt; Mac-1) zugegeben. Hierauf wurde erneut dreimal in PBS gewaschen (1, 3 und 5 Minuten), ehe für 45 Minuten der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (1:100 verdünnt) zugegeben wurde. Nach dreimaligem Waschen in PBS (1, 3 und 5 Minuten) wurden die Objektträger für 10-15 Minuten in eine Wanne mit Farbsubstrat gestellt, das die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase umsetzt. Anschließend wurde zweimal kurz in Aqua destillata gewaschen, ehe die Gegenfärbung der Objektträger für 5 Minuten mittels Hämalaun (1:3 verdünnt) erfolgte. Hierauf wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gebläut. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und mit heißer Glycerol-Gelatine eingedeckelt. Abschließend trockneten die Schnitte bei Raumtemperatur.

4.2.2 Bakteriologische Untersuchungen

Von Leber, Lunge, Milz und Nieren sowie von der Peritoneallavage und dem gewonnenen Blut wurden Bakterienkulturen angelegt. Während Lavage und Blut direkt zum Ausspateln

gelangen konnten, mussten die Organe noch aufbereitet werden. Dazu wurden sie innerhalb der Zentrifugenröhrchen mit dem Ultra-Thurax zerkleinert, so dass eine Gewebesuspension entstand. Auf Mikrotiterplatten wurden Verdünnungsreihen der suspendierten Organe, des Blutes und der Lavage in PBS-Lösung hergestellt.

Anschließend wurden je 10 µl der Verdünnungen 1:100 und 1:1000 auf Blutagarplatten gebracht und mit sterilen Glasspateln der üblichen Technik folgend verteilt. Nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien begutachtet und ausgezählt. Aus den Ergebnissen wurde dann die Anzahl Koloniebildender Einheiten pro Organ, bzw. bei Blut und Lavage pro ml Flüssigkeit errechnet.

4.2.3 Zytokin-Serumspiegel

Das in den Serumseparationsröhrchen befindliche Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme bei 4°C 15 Minuten lang mit 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das nun überstehende Serum bei -20°C eingefroren.

4.2.3.1 Prinzip des ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Die Spiegel der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-10 im Serum wurden nach der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik kommerzieller ELISA-Kits bestimmt. Dabei wird jeweils eine, mit hochaffinen und spezifisch gegen das nachzuweisende Zytokin gerichteten Antikörpern beschichtete, 96-well-Mikrotiterplatte verwendet. Nach Zugabe der Serumprobe werden die gesuchten Moleküle durch die fixierten, immobilisierten Antikörper in der Mikrotiterplatte - entsprechend einer Antigen-Antikörperreaktion - gebunden. Im folgenden Waschschrift werden sämtliche übrigen Probenbestandteile entfernt. Als nächstes wird ein an ein Enzym gekoppelter zweiter Antikörper zugegeben, der an die durch den fixierten Antikörper festgehaltenen Moleküle bindet. Das gesuchte Zytokin befindet sich nun zwischen zwei Antikörpern („Sandwich“). Durch einen weiteren Waschschrift werden alle nicht gebundenen sekundären Antikörper entfernt. Nun wird ein Substrat des am Sekundärantikörper befindlichen Enzyms zugegeben, welches eine Farbreaktion katalysiert, deren Intensität sich proportional zur Menge des gesuchten Zytokins in der Serumprobe verhält. Damit ist mit Hilfe eines Photometers die quantitative Zytokinbestimmung möglich.

4.2.3.3 Materialien

Verwendet wurden folgende ELISA-Kits:

- IL-1 β :
Quantikine® Murine, Mouse IL-1 β Immunoassay, Catalog Number MLB00, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place N.E., Minneapolis, Mn 55413, USA, <http://www.rndsystems.com>
- IL-10:
Quantikine® Murine, Mouse IL-10 Immunoassay, Catalog Number M1000, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place N.E., Minneapolis, Mn 55413, USA, <http://www.rndsystems.com>
- TNF α :
Quantikine® Murine, Mouse TNF α Immunoassay, Catalog Number MTA00, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place N.E., Minneapolis, Mn 55413, USA, <http://www.rndsystems.com>

4.2.3.4 Durchführung

Nach Auftauen der Serumproben auf Raumtemperatur wurden diese entsprechend Anleitung der Kits mit dem jeweiligen Diluent verdünnt (IL-1 β : 1:2, IL-10: 1:10, TNF α : 1:2). Anschließend erfolgte die Beschickung der Mikrotiterplatten mit den Standardverdünnungen und den Proben mit je 100 μ l pro Well. Nach Versiegelung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie wurde diese bei Raumtemperatur 2 Stunden auf einem horizontalen Shaker inkubiert. Hierauf erfolgte der 1. Waschschriff im Autowasher mit 5 x 400 μ l R&D-Wash Buffer. Als nächstes wurde 100 μ l Conjugate (2. Antikörper) in jedes Well gegeben, die Platte versiegelt und erneut für 2 Stunden inkubiert (s.o.). Nach abermaligem Waschen (s.o.) wurde 100 μ l Substrat in jedes Well pipettiert und 30 Minuten inkubiert (s.o.), anschließend erfolgte das Auslösen der Stoppreaktion durch Zugabe von 100 μ l Stop Solution in jedes Well. Nun wurde die optische Dichte der einzelnen Wells bei $\lambda = 450$ nm und $\lambda = 620$ nm als Referenz im Photometer gemessen. Die Auswertung der Messwerte und die Ermittlung einer Standardkurve aus den Werten der Standardverdünnungsreihe sowie die Errechnung der Molekülkonzentrationen in den eingesetzten Proben erfolgte mit dem Programm Molecular Dynamics XperimentTM. Abschließend wurden die gewonnenen Probenmesswerte mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.3 Gruppeneinteilung

Von beiden Operationsmodellen wurden zunächst Überlebenskinetiken ermittelt, wobei als Kontrolle jeweils die Sham-Operation diente. Als Gruppengröße wurde n=10 bzw. n=20 gewählt. Für die fotografische Dokumentation des Situs 24 Stunden postoperativ genügte ein Tier pro Gruppe (s. 4.1.5 Die Fotografien).

Bei der Organentnahme bestand eine Gruppe aus 4 bzw. 6-8 Tieren.

Gruppe	Stamm	Kinetik, n=	Foto nach 24h, n=	Ex nach 6h, n=	Ex nach 12h, n=	Ex nach 18h, n=	Ex nach 24h, n=
Sham-OP, Kinetik	C57Bl/6	10	-	-	-	-	-
CLP(1), Kinetik	C57Bl/6	20	-	-	-	-	-
CLP(2), Kinetik	C57Bl/6	20	-	-	-	-	-
18G-CASP, Kinetik	C57Bl/6	10	-	-	-	-	-
16G-CASP, Kinetik	C57Bl/6	10	-	-	-	-	-
14G-CASP, Kinetik	C57Bl/6	20	-	-	-	-	-
Sham-OP, Situs	C57Bl/6	-	1	-	-	-	-
CLP(1), Situs	C57Bl/6	-	1	-	-	-	-
CLP(2), Situs	C57Bl/6	-	1	-	-	-	-
14G-CASP, Situs	C57Bl/6	-	1	-	-	-	-
Sham-OP, Organentnahme	C57Bl/6	-	-	4	4	4	4
CLP(1), Organentnahme	C57Bl/6	-	-	8	8	8	7
CLP(2), Organentnahme	C57Bl/6	-	-	8	8	8	6
14G-CASP, Organentnahme	C57Bl/6	-	-	8	8	8	-
16G-CASP, Organentnahme	C57Bl/6	-	-	8	8	8	-

Abb. 3: Auflistung der OP-Gruppen

4.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit den Programmen SPSS und GraphPad Prism ausgewertet. Dabei wurde bei den Überlebenskinetiken der Log-Rank-Test nach Kaplan-Meier-Schätzung, und bei den ex vivo Versuchen der U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon verwendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Überlebenskinetiken der CLP und der CASP

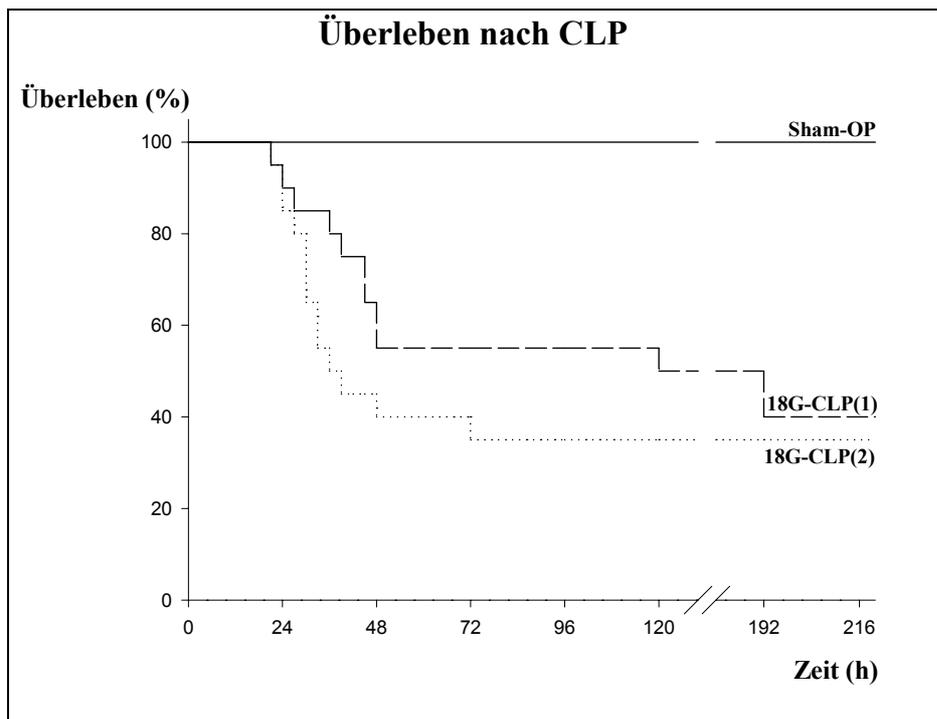


Abb. 4a: Überleben nach CLP abhängig von der Anzahl der Punktionen

Abbildung 4a zeigt das Ergebnis der Überlebenskinetik nach CLP. Die Sham-OP weist eine Letalität von 0% auf. 48 Stunden nach OP leben noch 55% der Tiere, die durch einfache Punktion mit einem 18G-Venenverweilkatheter (CLP(1)) behandelt wurden, und 40% der Gruppe mit zweifacher Punktion (CLP(2)). Gegen Ende der Studie nähern sich die beiden Kurven an, die endgültigen Werte ergeben eine Letalität von 60% für CLP(1) und 65% für CLP(2). Beide Kurven erweisen sich zwar gegenüber der Sham-OP als signifikant unterschiedlich (CLP(1): $p=0,003$; CLP(2): $p=0,002$), der direkte Vergleich von CLP(1) und CLP(2) ergibt jedoch keine Signifikanz hinsichtlich der Überlebensrate ($p=0,4$). Es zeigt sich, dass die Anzahl der Punktionen im CLP-Modell wohl keine Auswirkung auf das Überleben hat, wenngleich die CLP(2)-operierten Tiere etwas früher zu sterben scheinen. Im Gegensatz dazu existiert im CASP-Modell eine deutliche Korrelation zwischen verwendeter Stentgröße und Letalität, wie in Abb. 4b zu erkennen ist. Dabei wird erkennbar,

dass die Mortalität bei einem 14G-Stent mit 100% am höchsten ist, gefolgt von 70% bei einem 16G- und 50% bei einem 18G-Stent.

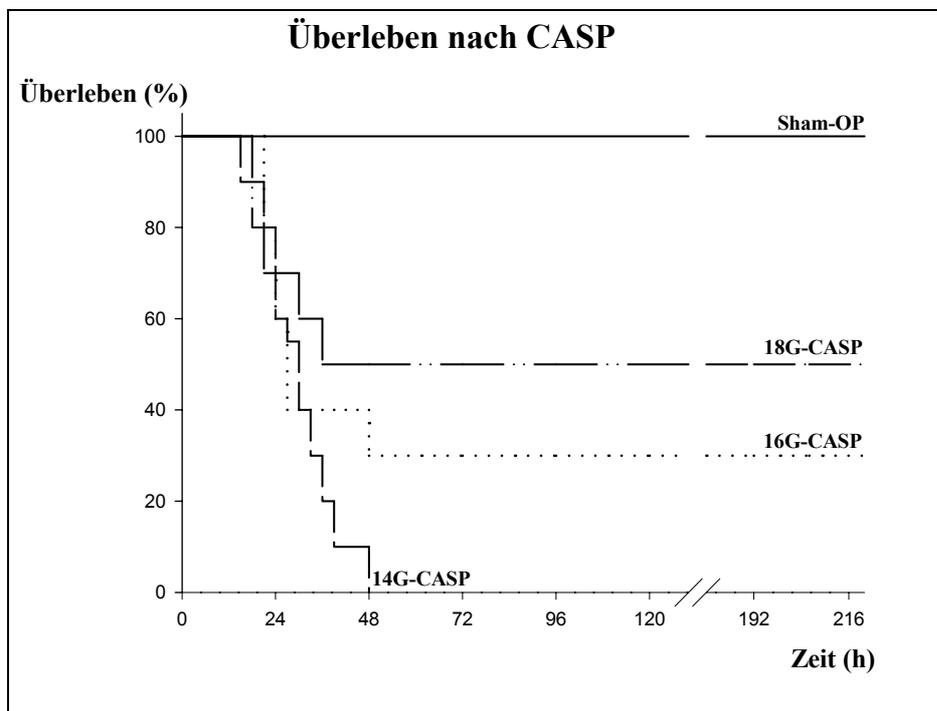


Abb. 4b: Überleben nach CASP abhängig von der Stentgröße

Insgesamt sind 48 Stunden nach der CASP-OP bereits die endgültigen Zahlen vorhanden, die sich bis zum Ende der Studie nach 9 Tagen (216h) nicht mehr ändern. Die Unterschiede der vier Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Test nach Kaplan-Meier ausgewertet. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Überleben bei allen verwendeten Stentgrößen gegenüber der Sham-OP (14G: $p < 0,001$; 16G: $p = 0,001$; 18G: $p = 0,01$). Außerdem ergibt der Vergleich von 14G und 18G ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,02$). Der Unterschied zwischen 14G und 16G ($p = 0,13$), bzw. 16G und 18G ($p = 0,5$) ist statistisch nicht signifikant. Dennoch ist ein Trend hinsichtlich des Zusammenhangs von Stentgröße und prozentualem Überleben nicht von der Hand zu weisen.

5.2 Situs 24 h nach OP

Auf den Fotos ist die makroskopische Auswirkung der Sham, CLP(1), CLP(2) und der CASP auf das Erscheinungsbild des Situs 24h nach OP zu sehen.



Abb. 5a: Sham-OP

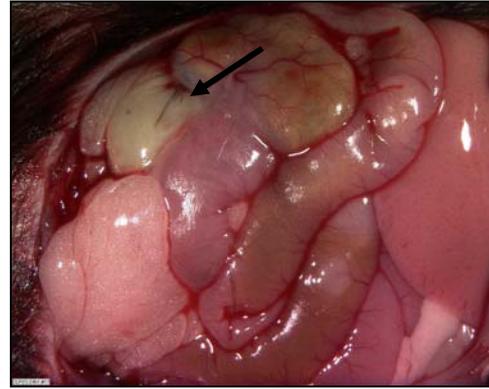


Abb. 5b: CLP(1)

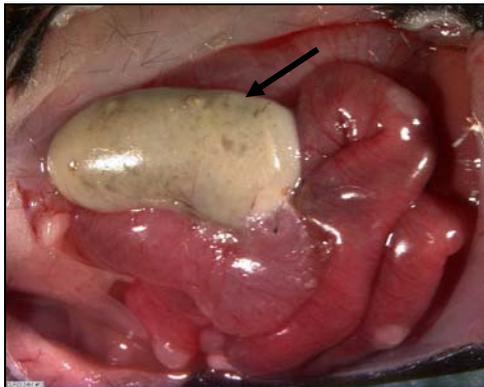


Abb. 5c: CLP(2)

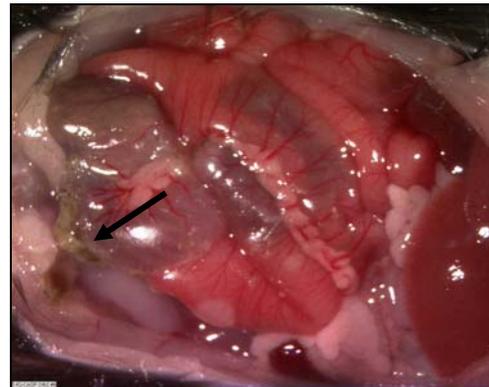


Abb. 5d: CASP

Im Vergleich zum Normalbefund der Sham (Abb. 5a) zeigen sich CLP(1), CLP(2) und CASP verändert. Der Situs der CLP(1) (Abb. 5b) erscheint leicht entzündet. Oben links im Bild erkennt man das ligierte Zökum (Pfeil).

Auf dem Bild der CLP(2) (Abb. 5c) ist das ligierte Zökum mit den beiden Punktionsstellen deutlich zu sehen, die umliegenden Darmschlingen sind leicht gerötet und etwas ödematös verändert. Die Peyerschen Plaques stellen sich hierdurch prominent dar. Obwohl das Zökum prall gefüllt ist, scheint nicht sehr viel Faeces auszutreten.

Die Aufnahme nach CASP (Abb. 5d) zeigt sämtliche Darmschlingen stark gerötet und ödematös aufgequollen, die Gefäßzeichnung ist aufgrund einer Hyperperfusion deutlich zu erkennen. Die Kontraktion des Dünndarms ist im Sinne eines paralytischen Ileus aufgehoben. Links unten im Bild ist der Stent sowie durch ihn ausgetretene Faeces zu sehen.

5.3 Histologie

Die folgenden Abbildungen zeigen Fotografien der histologischen Schnitte des proximalen Jejunums in den HE- und den immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern Mac-1 und Gr-1. Aufnahmen wurden 6h, 12h und 18h nach OP mit 40facher Vergrößerung gemacht.

5.3.1 HE-Färbung

5.3.1.1 Jejunum 6h nach Operation

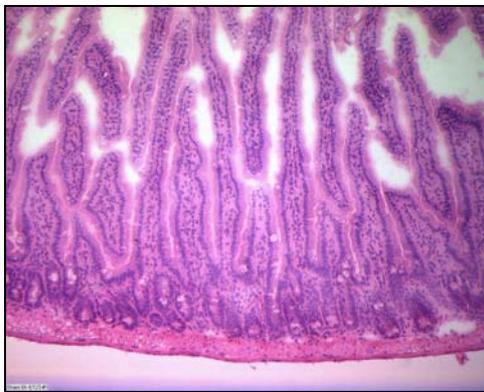


Abb. 6a: Sham, 6h, HE

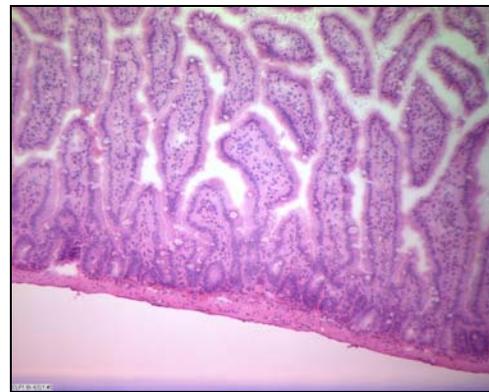


Abb. 6b: CLP(1), 6h, HE

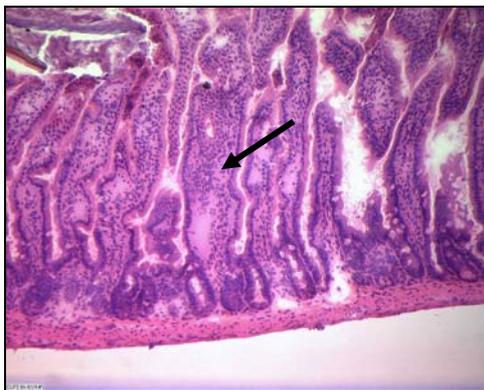


Abb. 6c: CLP(2), 6h, HE

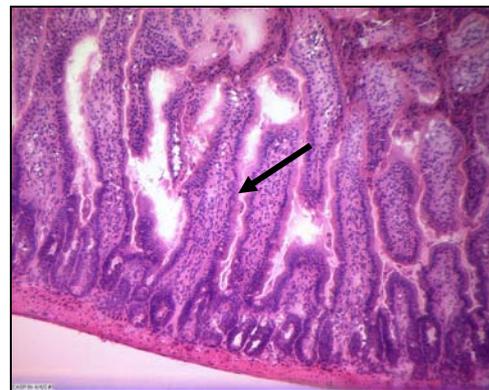


Abb. 6d: CASP, 6h, HE

Die Abbildungen der Sham und der CLP(1) entsprechen einem histologischen Normalbefund des Dünndarms, deutlich sind die ins Lumen ragenden Zotten zu erkennen. Bei CLP(2) und CASP hingegen zeigt sich bereits eine leicht gestörte Zottenarchitektur. Die Zotten erscheinen verbreitert mit fibrinösen Auflagerungen.

5.3.1.2 Jejunum 12h nach Operation



Abb. 7a: Sham, 12h, HE

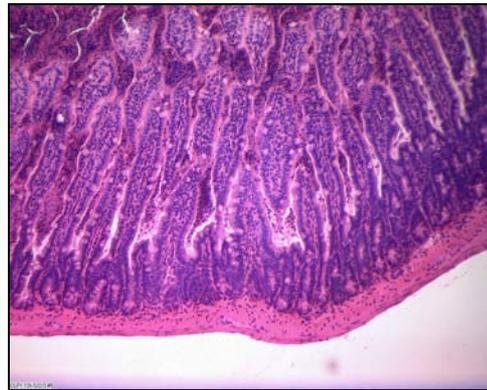


Abb. 7b: CLP(1), 12h, HE

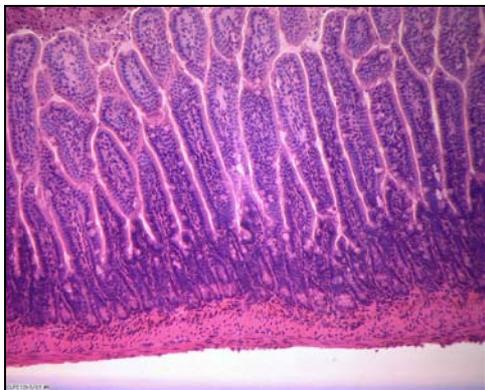


Abb. 7c: CLP(2), 12h, HE

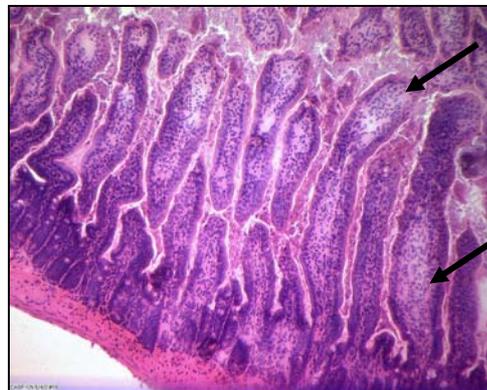


Abb. 7d: CASP, 12h, HE

Sham, CLP(1) und CLP(2) sehen 12 Stunden nach Operation weitgehend unauffällig aus, die 6 Stunden nach CLP(2) beobachtete Verbreiterung der Zotten zeigt sich rückläufig. Im Gegensatz dazu erkennt man bei der CASP eine deutliche Verbreiterung der Zotten, sie erscheinen ödematös aufgequollen und stark entzündlich infiltriert.

5.3.1.3 Jejunum 18h nach Operation

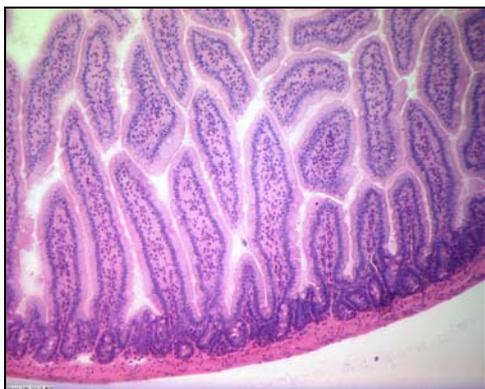


Abb. 8a: Sham, 18h, HE

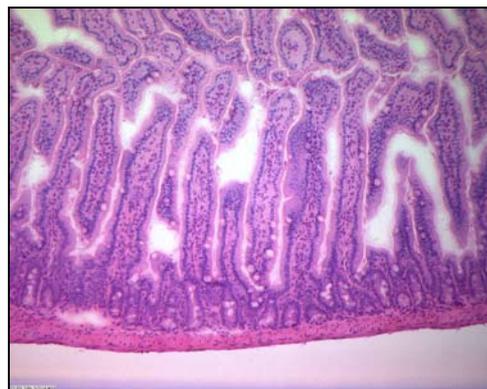


Abb. 8b: CLP(1), 18h, HE

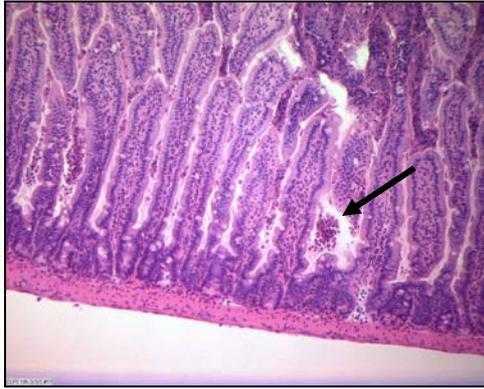


Abb. 8c: CLP(2), 18h, HE



Abb. 8d: CASP, 18h, HE

18 Stunden nach OP präsentieren sich Sham und CLP(1) unverändert. Bei CLP(2) sind Irritationen im Bereich der Zotten, sowie vereinzelt entzündliche Infiltrate zu sehen. Das Bild der CASP dagegen entspricht einer weitgehenden Zerstörung der Architektur, Nekrosen und massive entzündliche Infiltrate sind deutlich zu erkennen.

5.3.2 Gr-1-Färbung

5.3.2.1 Jejunum 6h nach Operation

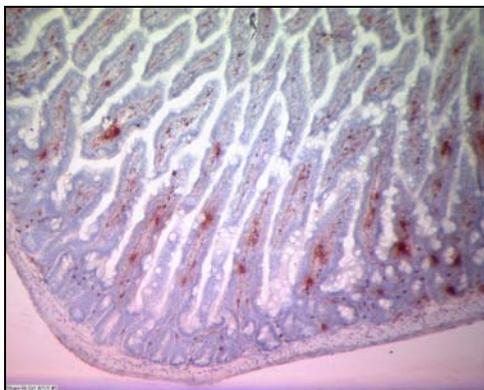


Abb. 9a: Sham, 6h, Gr-1

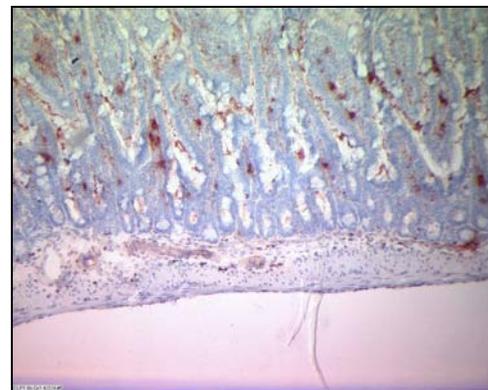


Abb. 9b: CLP(1), 6h, Gr-1

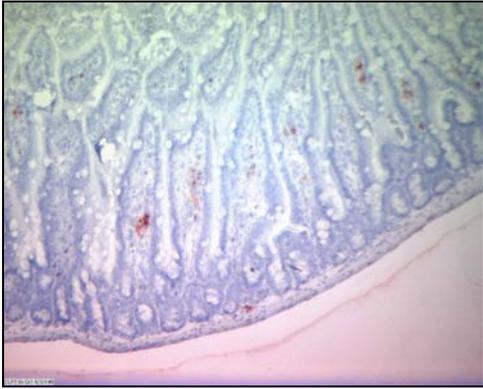


Abb. 9c: CLP(2), 6h, Gr-1



Abb. 9d: CASP, 6h, Gr-1

Der Antikörper Gr-1 bindet an Granulozyten, der Sekundärantikörper wiederum bindet an Gr-1 und lässt die Granulozyten in der Färbung rot erscheinen. 6h nach OP gibt es zwischen Sham, CLP(1), CLP(2) und CASP keine wesentlichen Unterschiede, in den Zotten sind vereinzelt Granulozyten zu sehen, die bei der CASP allerdings ein wenig kumuliert erscheinen.

5.3.2.2 Jejunum 12h nach Operation

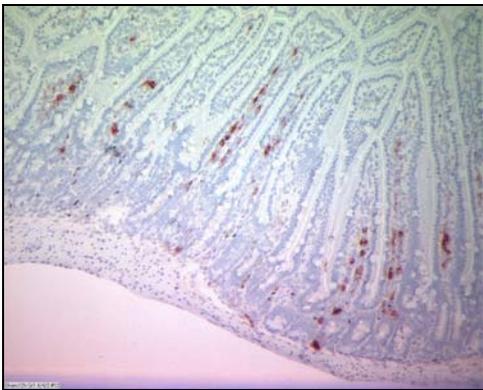


Abb. 10a: Sham, 12h, Gr-1

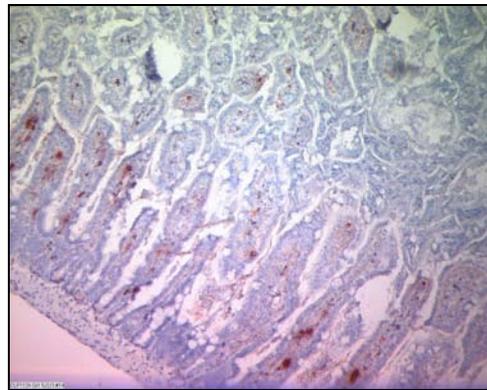


Abb. 10b: CLP(1), 12h, Gr-1

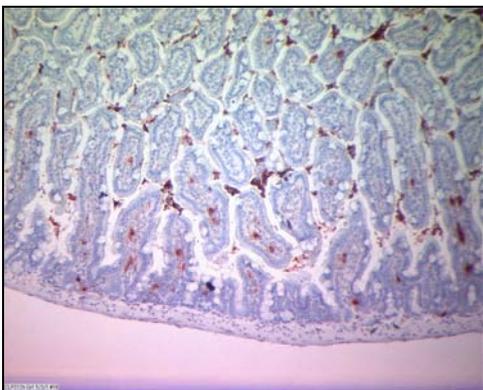


Abb. 10c: CLP(2), 12h, Gr-1

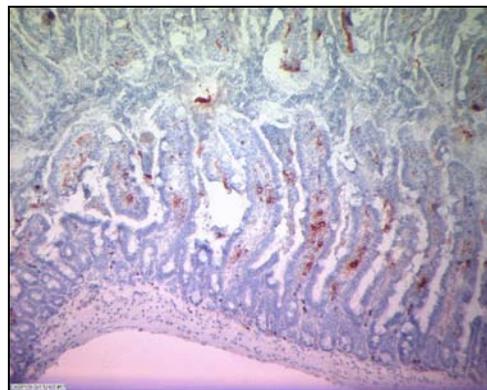


Abb. 10d: CASP, 12h, Gr-1

Insgesamt zeigt sich nach 12 Stunden ein ähnliches Bild wie 6 Stunden zuvor. Bei der CASP fällt, wie schon zuvor in der HE-Färbung sichtbar, die Zerstörung der Zottenarchitektur auf.

5.3.2.3 Jejunum 18h nach Operation

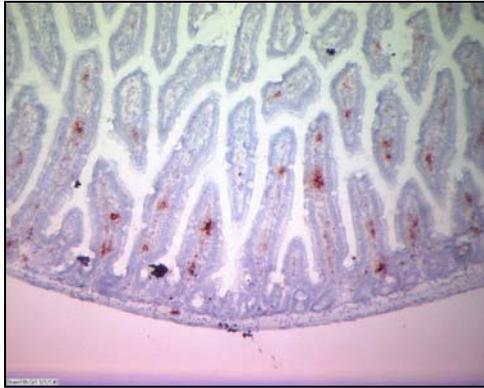


Abb. 11a: Sham, 18h, Gr-1

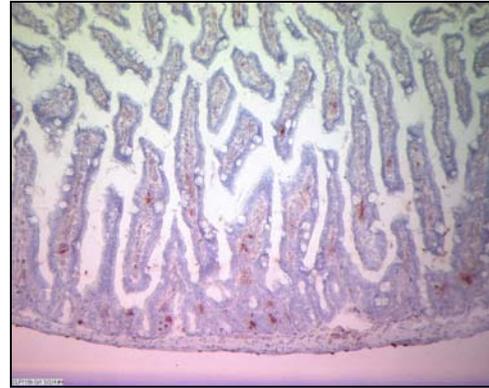


Abb. 11b: CLP(1), 18h, Gr-1

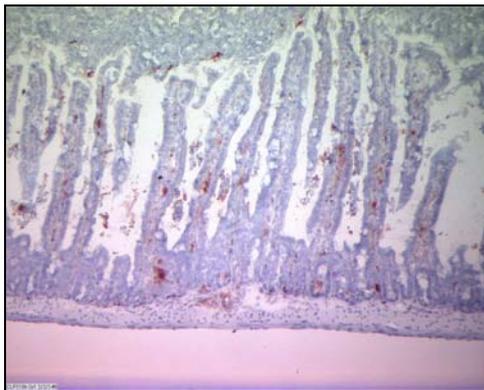


Abb. 11c: CLP(2), 18h, Gr-1

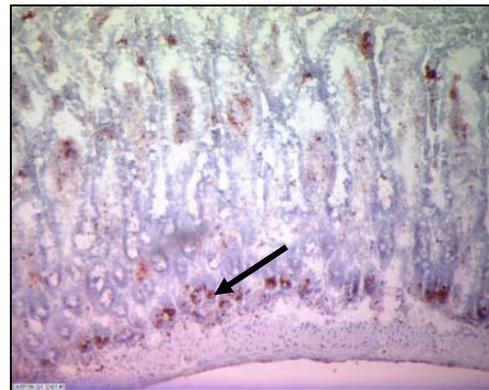


Abb. 11d: CASP, 18h, Gr-1

18 Stunden nach OP zeigen sich Sham und CLP(1) ähnlich, intaktes Zottenmuster mit vereinzelt Granulozyten. Auch bei CLP(2) scheint die Zahl der Granulozyten unverändert, allerdings sind Schäden an den Zotten nicht zu übersehen. Unter diesem Gesichtspunkt ist das Bild der CASP verheerend, außerdem sind Granulozytenaggregate deutlich zu erkennen.

5.3.3 Mac-1-Färbung

5.3.3.1 Jejunum 6h nach Operation



Abb. 12a: Sham, 6h, Mac-1



Abb. 12b: CLP(1), 6h, Mac-1

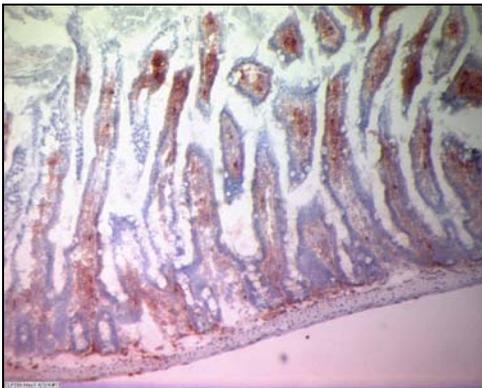


Abb. 12c: CLP(2), 6h, Mac-1

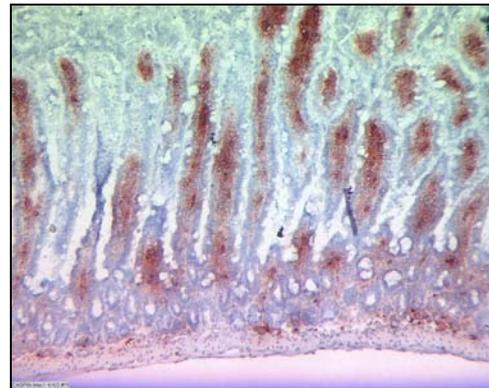


Abb. 12d: CASP, 6h, Mac-1

Der Antikörper Mac-1 bindet an Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen. Durch den Sekundärantikörper entsteht deren rötliche Färbung auf den Schnitten. 6 Stunden nach OP erscheinen die Mac-1-positiven Zellen in Sham, CLP(1), CLP(2) und CASP etwa gleich häufig und gleichmäßig verteilt.

5.3.3.2 Jejunum 12h nach Operation

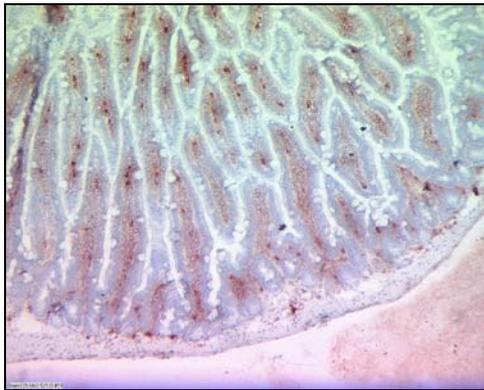


Abb. 13a: Sham, 12h, Mac-1

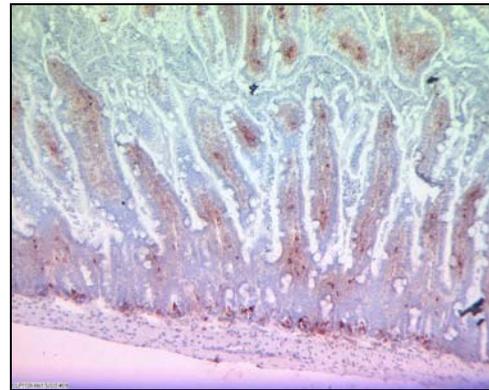


Abb. 13b: CLP(1), 12h, Mac-1

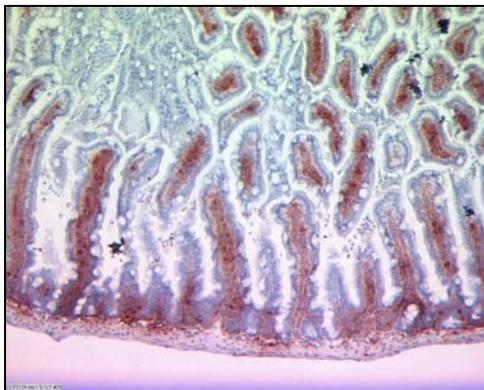


Abb. 13c: CLP(2), 12h, Mac-1

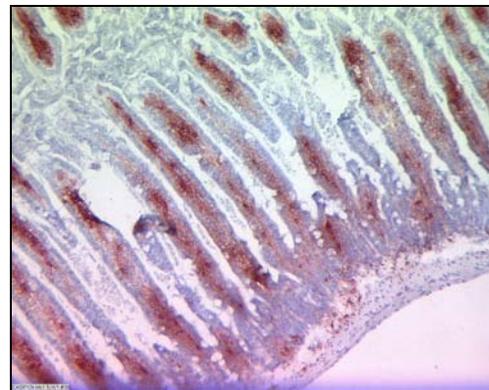


Abb. 13d: CASP, 12h, Mac-1

CLP(2) und CASP weisen 12 Stunden nach OP deutlich stärkere Anfärbungen als Sham und CLP(1) auf. Dabei ist in der CASP eine Tendenz zur Aggregatbildung der gefärbten Zellen zu erkennen.

5.3.3.3 Jejunum 18h nach Operation

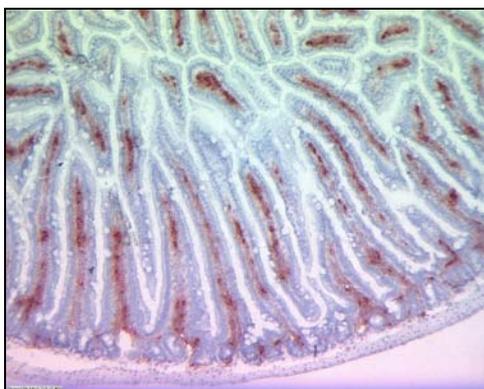


Abb. 14a: Sham, 18h, Mac-1

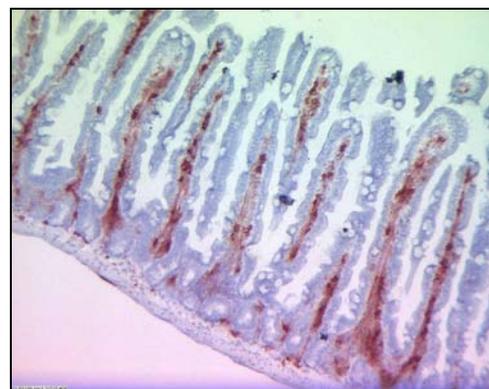


Abb. 14b: CLP(1), 18h, Mac-1

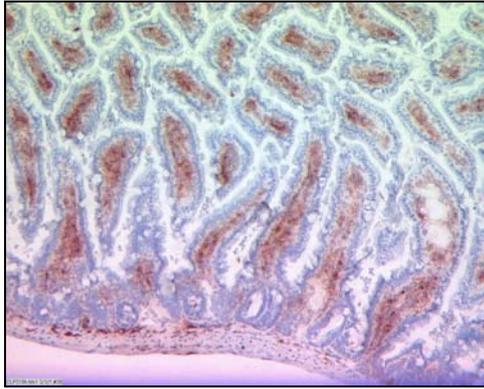


Abb. 14c: CLP(2), 18h, Mac-1

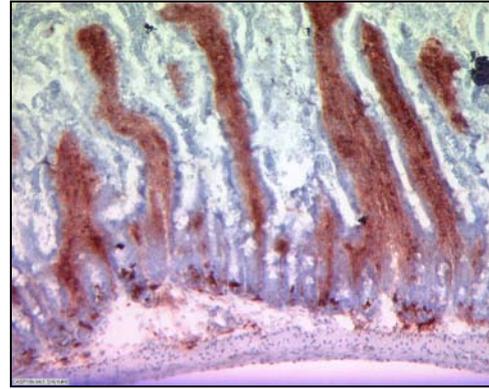


Abb. 14d: CASP, 18h, Mac-1

Nach 18 Stunden ist klar zu erkennen, dass die Färbung in der CASP am stärksten ausgebildet ist, die Zotten sind von Mac-1-positiven Zellen ausgefüllt. Sham, CLP(1) und CLP(2) unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander.

5.4 Bakteriologische Untersuchungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Bakteriologien von Blut, Peritoneallavage, Leber, Milz, Nieren und Lunge. Dargestellt sind in den Grafiken nur die Daten von CLP(1), CLP(2) und 14G-CASP, da die Ergebnisse nach 14G- und 16G-CASP ähnlich waren und in allen angelegten Kulturen der Sham-operierten Mäuse keinerlei Bakterienwachstum nachweisbar war.

5.4.1 Peritoneallavage

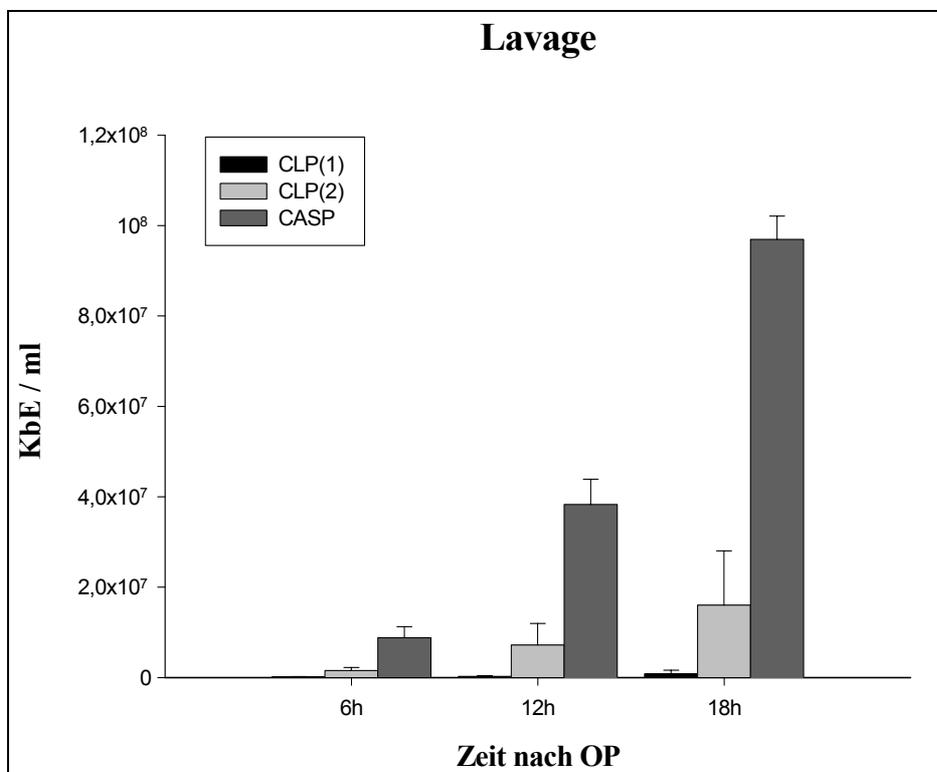


Abb. 15: Bakteriologie der Peritoneallavage

Für CLP(1) und CLP(2) ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede der Bakterienzahlen zu den verschiedenen Zeitpunkten (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,4$). Die CASP hingegen zeigt eine hochsignifikante Zunahme der gefundenen Bakterien in der Lavage (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p = 0,0003$).

5.4.2 Leber

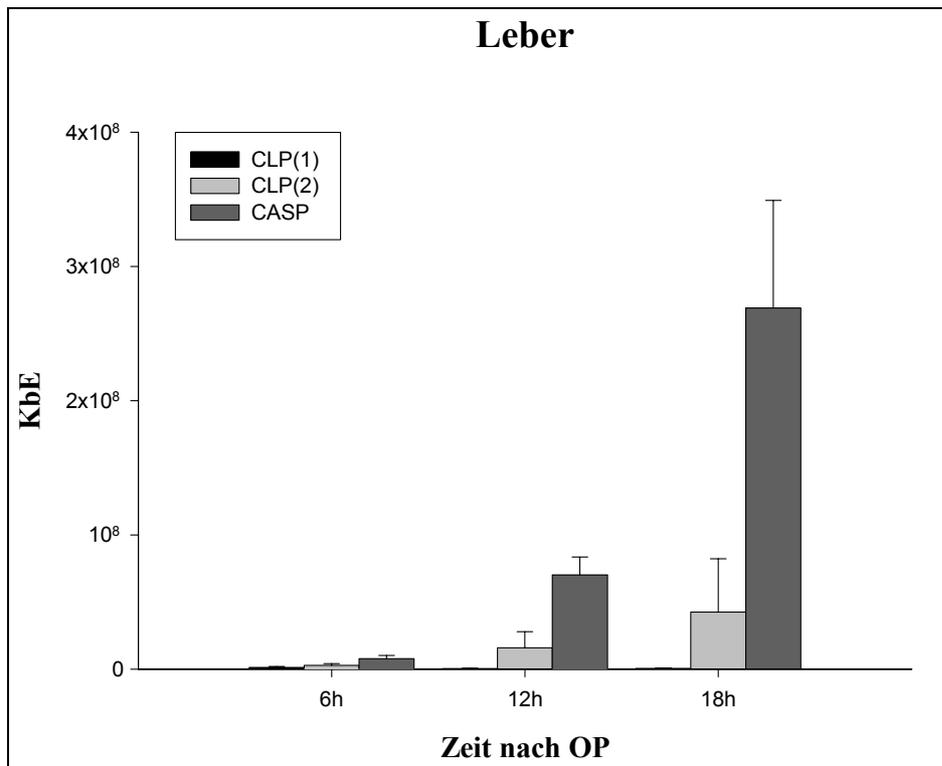


Abb. 16: Bakteriologie der Leber

In der Leber ergeben sich für CLP(1) und CLP(2) keinerlei signifikante Unterschiede der Bakterienzahlen zu den verschiedenen Zeitpunkten (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,2$). Die CASP hingegen zeigt eine hochsignifikante Zunahme der gefundenen Bakterien in der Leber (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p < 0,008$).

5.4.3 Milz

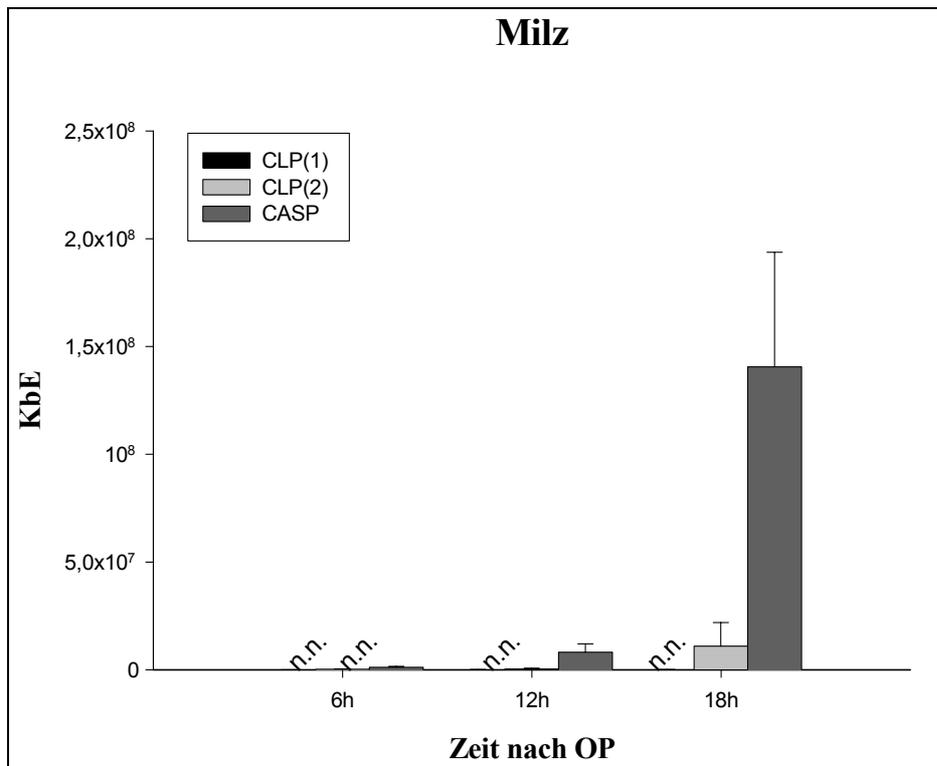


Abb. 17: Bakteriologie der Milz

In der Milz sind zu keinem Zeitpunkt nach CLP(1) Bakterien nachweisbar. Erst 12 Stunden nach CLP(2) ist eine minimale Anzahl Bakterien vorhanden, die nach 18 Stunden leicht ansteigt. Signifikanz wird dabei nicht erreicht (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,3$). In der CASP zeigen sich 6 Stunden nach OP bereits geringe Bakterienzahlen, die über eine Steigerung nach 12 Stunden einen hohen Wert nach 18 Stunden erreichen. Der Anstieg ist zu allen Zeitpunkten hochsignifikant (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p < 0,003$).

5.4.4 Nieren

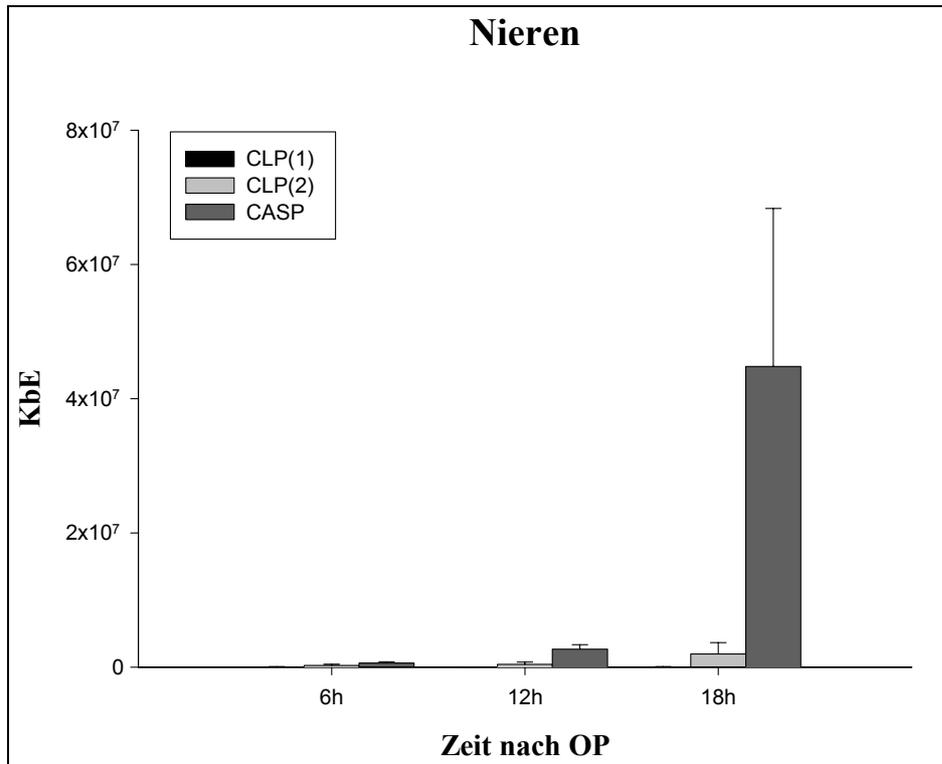


Abb. 18: Bakteriologie der Nieren

Durchgehend geringe Bakterienzahlen und keine signifikanten Unterschiede nach CLP(1) und CLP(2) zeigen sich in den Nieren (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,5$). Nach CASP erreichen die Bakterien hohe Werte 18 Stunden nach OP (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p < 0,02$).

5.4.5 Lunge

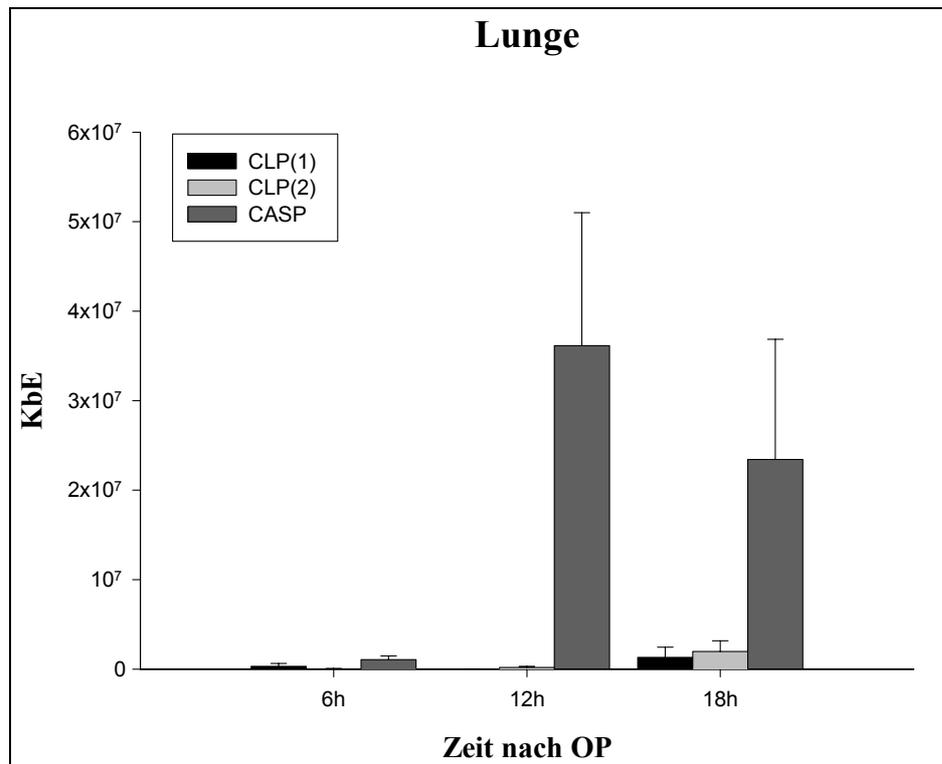


Abb. 19: Bakteriologie der Lunge

Auch in der Lunge gibt es nach CLP(1) und CLP(2) zu keinem Zeitpunkt hohe Werte, bzw. signifikante Unterschiede (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,2$). 12 Stunden nach CASP sind hohe Bakterienzahlen vorhanden, die zu 18 Stunden hin leicht rückläufig erscheinen (6h vs. 12h, 6h vs. 18h: jeweils $p < 0,05$; 12h vs. 18h: $p = 0,27$).

5.4.6 Blut

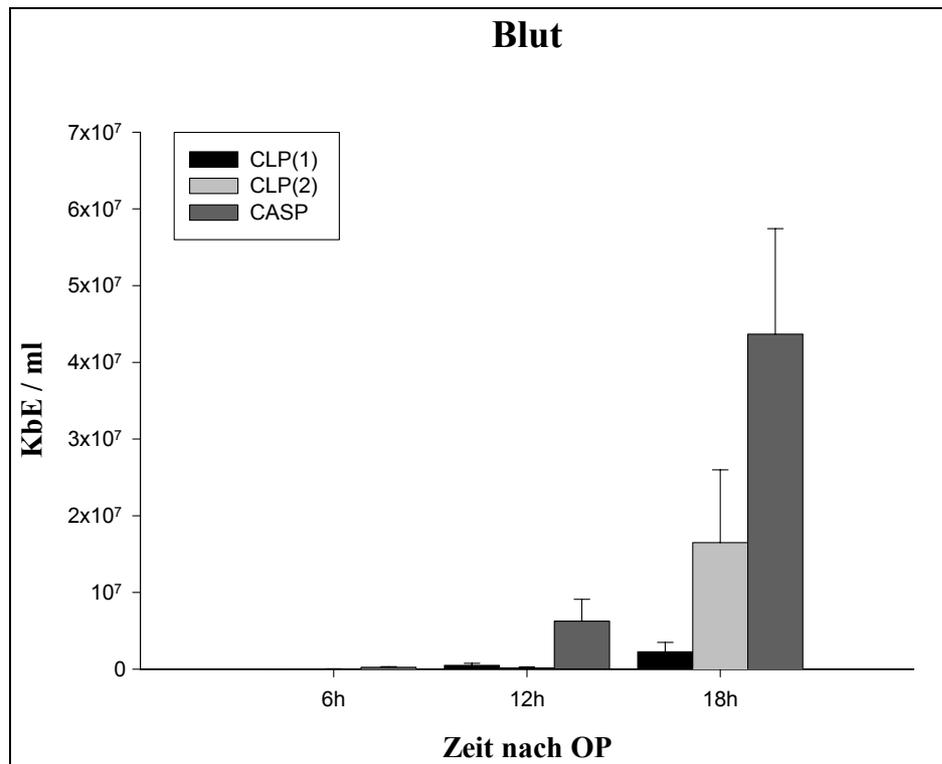


Abb. 20: Bakteriologie des Blutes

6 Stunden nach OP zeigt sich in allen drei Modellen eine geringe Bakterienzahl im Blut. Nach 12 Stunden ist in der CASP bereits eine deutliche Bakteriämie zu erkennen. 18 Stunden nach OP ist bei allen Modellen eine Bakteriämie nachweisbar, die allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Auch hier erreicht nur die CASP signifikante Unterschiede zu allen Zeitpunkten (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p < 0,05$). Bei der CLP(1) zeigt sich eine signifikante Zunahme der Bakterien im Blut zwischen 6 und 18 Stunden nach OP ($p = 0,03$). Zu den übrigen Zeitpunkten, sowie bei der gesamten CLP(2) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (6h vs. 12h, 12h vs. 18h, 6h vs. 18h: jeweils $p > 0,08$).

Die Bakteriologien zeigen, dass nach CASP in allen untersuchten Organen, mit Ausnahme der Lunge, eine kontinuierliche Zunahme der Bakterienzahlen stattfindet. Dies bedeutet nicht nur einen lokalen - wie bei CLP - , sondern auch einen systemischen Anstieg der Bakterien infolge der CASP. Außerdem sind nach CASP die absoluten Bakterienzahlen in sämtlichen untersuchten Organen zu allen Zeitpunkten mit Abstand am höchsten.

5.5 Zytokinspiegel im Serum

Im Folgenden sind die Ergebnisse der mittels ELISA ermittelten Serumanalyse von TNF- α , IL-1 β und IL-10 abgebildet. TNF- α und IL-1 β sind klassische proinflammatorische Zytokine und wurden deswegen zur Analyse herangezogen. IL-10 wurde ausgewählt, weil sich hierfür in Vorarbeiten eine wesentliche Rolle beim Überleben abdomineller Sepsis gezeigt hat [29, 43]. Da die Zytokinspiegel nach 14G- und 16G-CASP ähnlich waren, werden hier nur die Ergebnisse der 14G-CASP dargestellt.

5.5.1 TNF- α

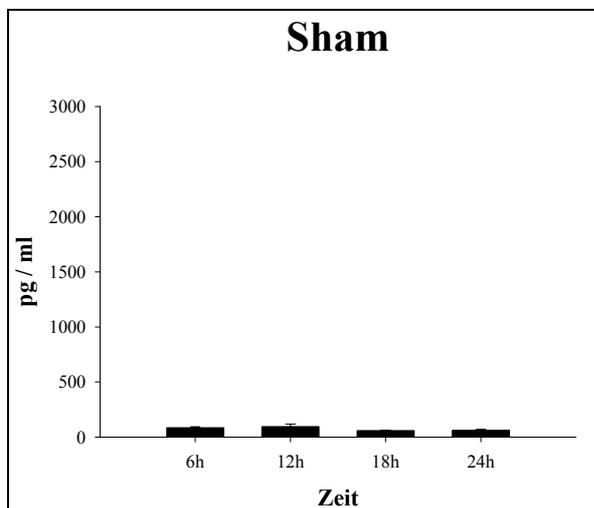


Abb. 21a: TNF- α nach Sham-OP

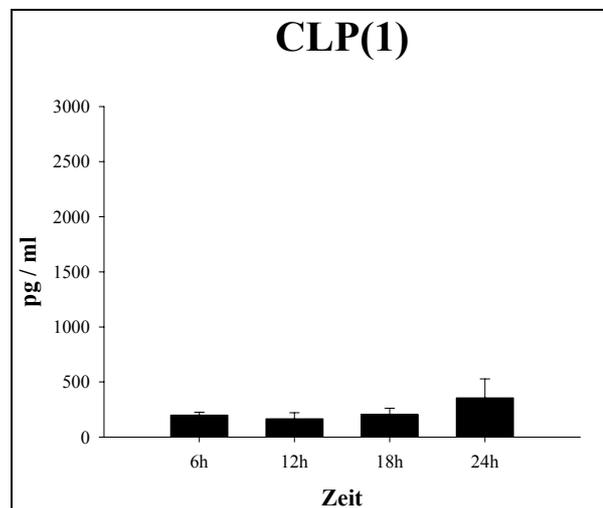


Abb. 21b: TNF- α nach CLP(1)

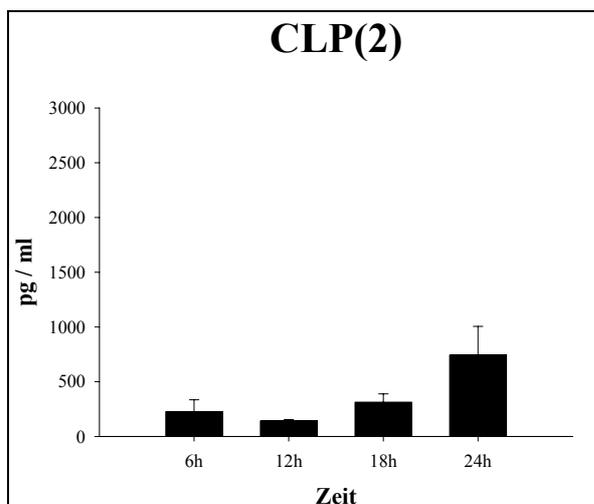


Abb. 21c: TNF- α nach CLP(2)

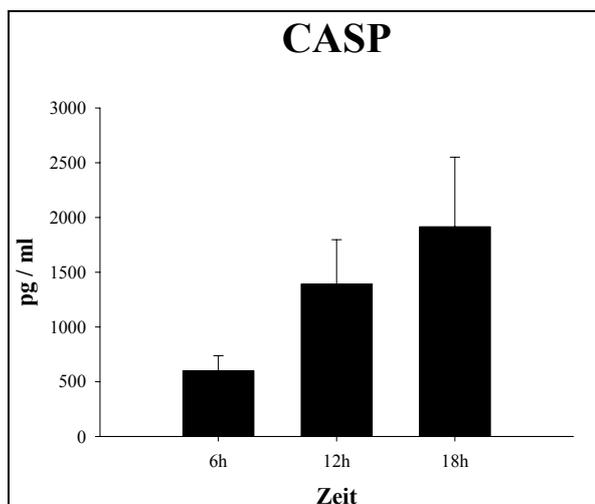


Abb. 21d: TNF- α nach CASP

Die Serumspiegel von TNF- α nach CLP(1) und CLP(2) unterscheiden sich allenfalls nach 24 Stunden voneinander, ansonsten verändern sie sich kaum und sind im Vergleich zur Sham-Gruppe nur gering erhöht. Bei der CASP hingegen zeigt sich bereits 6 Stunden nach OP ein deutlich erhöhter Wert, der im Verlauf kontinuierlich zunimmt. Statistisch ergibt sich, abgesehen von einem signifikanten Unterschied des nach CLP(2) gemessenen 24h-Wertes gegenüber dem 6h- und dem 12h-Wert ($p=0,02$ bzw. $p=0,01$), nach keinem OP-Verfahren eine signifikante Zunahme des TNF- α -Spiegles zu den einzelnen Zeitpunkten. Gleichwohl zeigt sich nur nach CASP eine stetige Zunahme des TNF- α -Wertes im Sinne einer sich kontinuierlich entwickelnden Sepsis.

5.5.2 IL-1 β

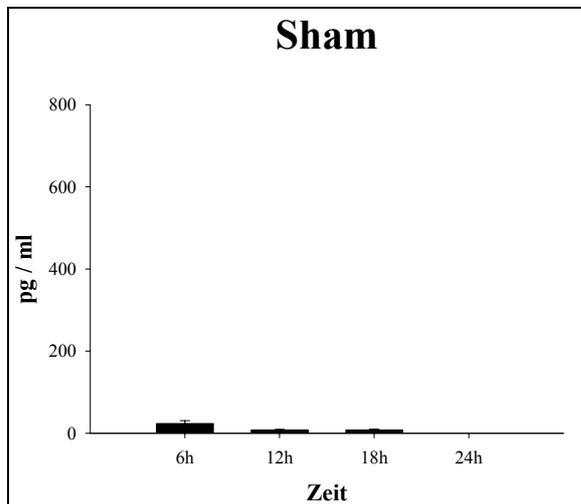


Abb. 22a: IL-1 β nach Sham-OP

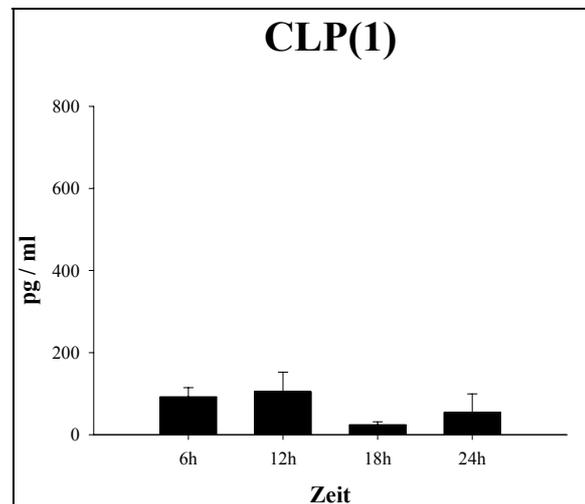


Abb. 22b: IL-1 β nach CLP(1)

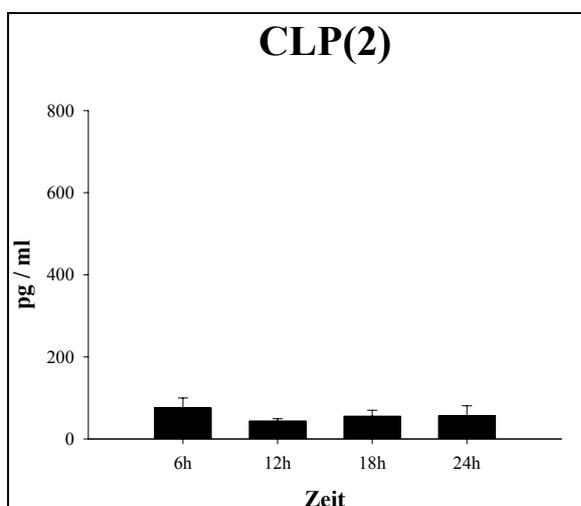


Abb. 22c: IL-1 β nach CLP(2)

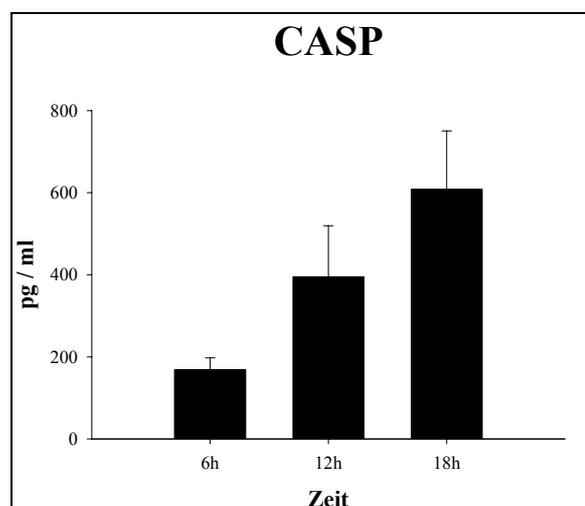


Abb. 22d: IL-1 β nach CASP

Minimale Werte von IL-1 β lassen sich bis 18 Stunden nach Sham-OP im Serum messen, 24 Stunden nach OP ist IL-1 β nicht mehr nachweisbar.

Nach CLP(1) und CLP(2) zeigt sich in etwa das gleiche Bild: Gegenüber den Sham-Werten ist IL-1 β jeweils leicht erhöht. Bei CLP(1) ist der IL-1 β -Spiegel nach 6, bzw. 12 Stunden höher als zu den beiden späteren Zeitpunkten, während er bei CLP(2) die gesamte Zeit etwa gleich hoch ist. Eine signifikante Zunahme von IL-1 β ist sowohl nach CLP(1) als auch nach CLP(2) zu keinem Zeitpunkt gegeben.

Der CASP folgt bereits 6 Stunden nach OP ein IL-1 β -Spiegel von knapp 200 pg/ml, ein Wert, der im Verlauf kontinuierlich ansteigt. Die Zunahme des IL-1 β -Wertes von 6h auf 18h ist signifikant ($p=0,03$).

5.5.2 IL-10

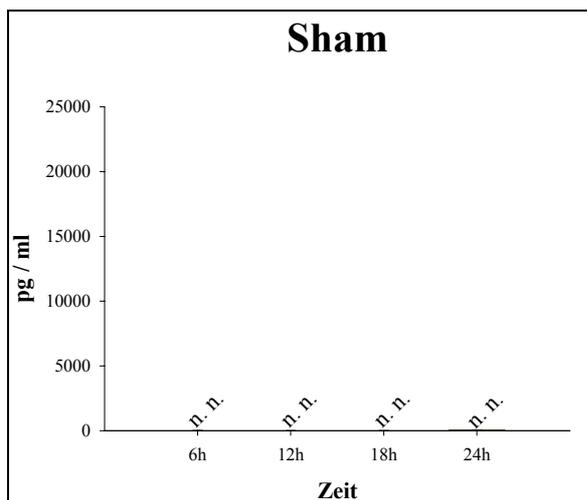


Abb. 23a: IL-10 nach Sham-OP

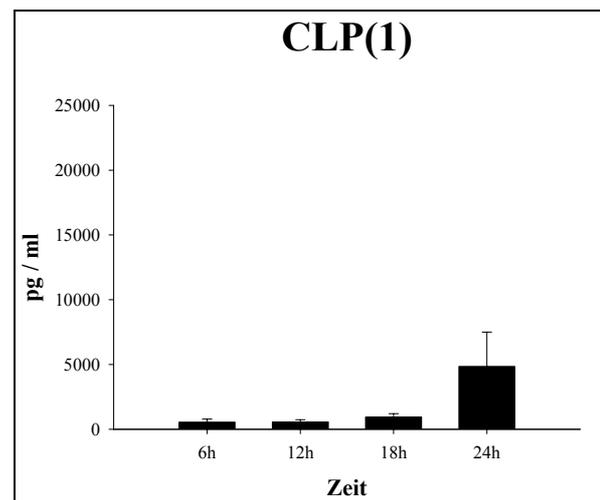


Abb. 23b: IL-10 nach CLP(1)

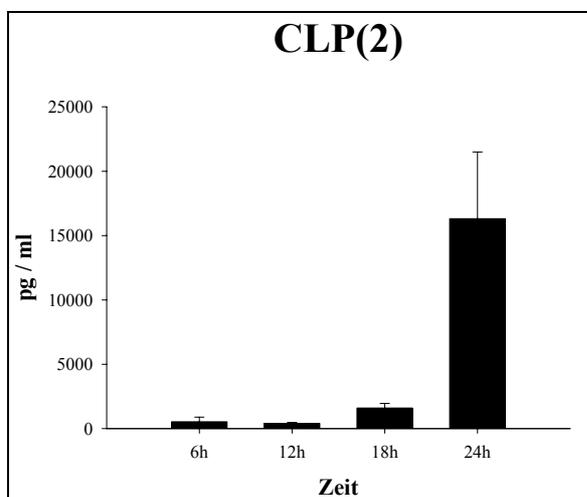


Abb. 23c: IL-10 nach CLP(2)

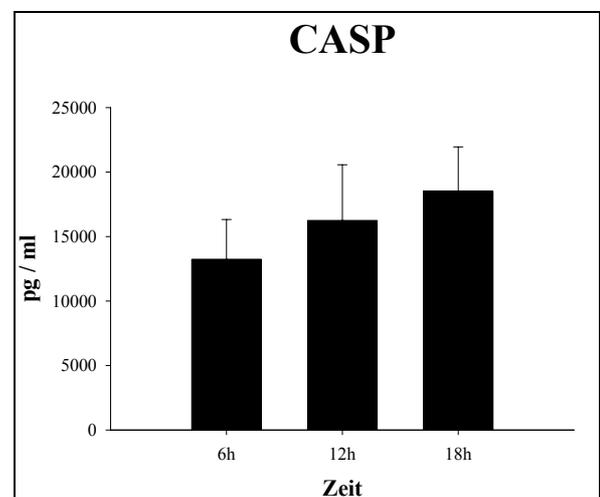


Abb. 23d: IL-10 nach CASP

IL-10 konnte zu keinem Zeitpunkt nach Sham-OP im Serum nachgewiesen werden.

Nach CLP(1) zeigt sich 6, 12 und 18 Stunden nach OP ein geringfügig erhöhter IL-10-Wert, der allerdings 24 Stunden nach OP deutlich sichtbar ansteigt. Bei CLP(2) findet sich bis 18 Stunden nach OP ein ähnliches Bild, ehe es 24 Stunden nach OP zu einem fulminanten und signifikanten Anstieg von IL-10 kommt ($p=0,002$).

Wie schon bei TNF- α und IL-1 β ergibt auch die Messung von IL-10 nach CASP ein treppenförmiges Bild: 6 Stunden nach OP liegt bereits ein hoher Wert vor, der bis 18 Stunden nach OP noch ansteigt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten liegen dabei allerdings nicht vor.

Die Ergebnisse zeigen bei CLP gegenüber Sham geringfügig erhöhte Serumwerte der gemessenen Zytokine, was einer Entzündung entspricht, welche aber nicht zu einer systemischen Reaktion führt. Das Bild entspricht dem eines intraabdominellen Abszesses. Nach CASP hingegen steigen alle gemessenen Zytokine kontinuierlich an und erreichen sehr hohe Werte, was für eine systemische Reaktion im Sinne einer Sepsis spricht.

6 Diskussion

Die durchgeführten Versuche dienten dem Ziel, einen objektiven Vergleich zwischen zwei operativen Modellen zur Erzeugung einer polymikrobiellen intraabdominellen Sepsis im Tierversuch anzustellen. Auf der einen Seite die CLP, die sich, 1980 etabliert, seitdem zum meistverwendeten operativen Sepsismodell entwickelt hat [64, 86]. Auf der anderen Seite die CASP, die ca. 20 Jahre später publiziert worden ist [90].

Wichterman selbst, der Erfinder der CLP, stellte in seiner Publikation wichtige Kriterien für ein gutes Sepsismodell auf: Es müsse technisch einfach, billig, an großen Stückzahlen kleiner Tiere durchführbar und statistisch reproduzierbar sein [86]. Besonders der letzte Punkt ist von Bedeutung, denn CASP und CLP erheben jeweils den Anspruch, dass die Letalität durch Variationen im Modell kontrollierbar sei. Um dies zu überprüfen, wurden innerhalb des jeweiligen Modells Überlebenskinetiken operiert. Für die CASP konnte gezeigt werden, dass sie mit dem 14G-Stent eine voll letale Variante besitzt. Fein abgestuft nimmt die Letalität mit dem Durchmesser des Stents (16G, 18G) ab. Die Überlebenskurven in der CASP hängen also vom Durchmesser des verwendeten Stents ab.

Für zwei verschiedene Varianten der CLP wurden Überlebenskurven angefertigt, nämlich eine CLP mit einem 18G-Stent und zweifacher Punktion des Zökums (CLP(2)) und eine mit 18G-Stent und einfacher Punktion (CLP(1)). Ausgewählt wurden diese beiden Vertreter der CLP, da die CLP(2) das letalste von Wichterman vorgeschlagene Modell mit einer Letalität von 94 % ist, gefolgt von der CLP(1) mit 90 % binnen 120 Stunden [86]. Nach 48 Stunden lag bei Wichterman die Letalität der CLP(2) bereits bei 94%, während erst 70 % der CLP(1)-operierten Tiere gestorben waren [86]. Die Ergebnisse unserer CLP-Kinetik ergaben nach 48 Stunden eine Letalität von 60 % für CLP(2), von 45 % für CLP(1), sowie nach 192 Stunden eine Letalität von 65 % für CLP(2) und 60 % für CLP(1). Im Vergleich zu Wichtermans Daten erkennt man dabei eine Analogie und einen Unterschied. Der Unterschied ist die Gesamtletalität der Operationen, sowohl der CLP(2) als auch der CLP(1), die in den aktuellen Ergebnissen jeweils um ca. 30 % niedriger liegt als in Wichtermans Daten. Analog dagegen ist der Verlauf: Nach 48 Stunden weist die CLP(1) jeweils eine deutlich geringere Letalität auf als die CLP(2), welche sich dieser allerdings in beiden Studien nach 120 bzw. 196 Stunden stark annähert.

Den Unterschied in der Gesamtletalität damit zu erklären, dass Wichterman bei seinen Versuchen Ratten verwendete, während die aktuellen Daten an Mäusen erhoben wurden,

genügt sicher nicht. Baker et al., die CLP erstmals an Mäusen durchführten, erhielten eine Überlebenskinetik, deren Daten sich sowohl von Wichtermans als auch von unseren unterscheiden [3]. Dieser Umstand lässt sich möglicherweise auf Schwierigkeiten bei der Standardisierbarkeit der CLP-OP-Technik zurückführen. So könnte es von erheblicher Bedeutung sein, wo genau man die Ligatur des Zökums setzt und wie stark man diese zusammenzieht. Diese beiden Arbeitsschritte sind jedoch schwierig zu standardisieren und somit wäre für die CLP ein wichtiges Kriterium Wichtermans für ein gutes Sepsismodell gerade nicht erfüllt.

Die Kinetiken haben gezeigt, dass die CASP der CLP in Bezug auf kontrollierte Variation der Letalität überlegen ist, die Abstufung in der CASP zwischen 14G, 16G und 18G ist klar zu sehen. Bei der CLP hingegen verschwindet der nach 48 Stunden vorhandene deutliche Unterschied zwischen CLP(1) und CLP(2) umso mehr, je länger die Studie andauert. Daraus folgt auch, dass das durch CLP ausgelöste Geschehen nach 48 Stunden noch nicht abgeschlossen ist, während jedes Tier, das eine CASP 48 Stunden lang überlebt hat, mit ziemlicher Sicherheit nicht mehr sterben wird. Die CASP erfüllt somit wichtige Kriterien eines guten Sepsismodells, nämlich Wiederholbarkeit und statistische Relevanz.

Zur makroskopischen Dokumentation wurden Fotografien des Situs 24 Stunden nach CLP und CASP aufgenommen (Abb. 4a-d). Bei der CLP ist zu diskutieren, dass zumindest ein Teil der nicht zu übersehenden Entzündung durch den stark traumatisierenden Eingriff selbst verursacht und somit unabhängig von der bakteriellen Belastung ist. Mit der Ligatur wird die Blutversorgung des Zökums unterbrochen, es resultiert eine Nekrose größeren Ausmaßes, die Anlass genug für eine Entzündung der umliegenden Gebiete ist. Die Punktion des Zökums scheint zumindest bei der CLP(2) eine Rolle zu spielen: Auf dem Foto (Abb. 4c) sind die beiden Löcher gut zu erkennen, allerdings ist der Austritt von Faeces minimal. Die Ursache für die massive Peritonitis nach CASP ist die großlumige Verbindung des Darmlumens und des Peritoneums, die durch den Stent offengehalten wird; deutlich ist ausgetretene Faeces auf dem Foto (Abb. 4e) zu erkennen. Das Operationstrauma ist im Vergleich gering einzuschätzen, makroskopisch sind keine Nekrosen zu sehen.

Mikroskopisch wurde das Vorhandensein, bzw. die Ausbreitung einer Peritonitis überprüft, indem Gefrierschnitte des Dünndarms auf drei Arten gefärbt wurden: HE, Gr-1 und Mac-1. Bewusst wurde dafür proximales Jejunum gewählt, also ein Darmabschnitt, der anatomisch sowohl bei CLP als auch bei CASP möglichst weit vom septischen Fokus entfernt ist. Die Ergebnisse zeigen zunächst, dass CLP(1) offensichtlich wenig bis gar keine Auswirkungen auf das proximale Jejunum hat. Das heißt, 18 Stunden nach OP kann bei CLP(1) von einer

generalisierten Peritonitis nicht die Rede sein. Für die CLP(2) lässt sich zusammenfassend sagen, dass 6 Stunden nach OP entzündliche Veränderungen im Darm sichtbar sind, die sich im Verlauf allerdings rückläufig zeigen. Die kontinuierliche Entwicklung einer Peritonitis ist somit auch hier nicht zu verfolgen. Anders sieht es bei der CASP aus. Hier nehmen die Zeichen der Destruktion bzw. der Entzündung von Zeitpunkt zu Zeitpunkt zu. Insgesamt zeigt sich durch die histologischen Untersuchungen, dass das aus der OP resultierende Geschehen im Falle der CASP einen kontinuierlichen, sich steigernden Verlauf nimmt, wohingegen in beiden Formen der CLP diese Kontinuität nicht zu erkennen ist.

CASP und CLP sind Modelle für die bakterielle Sepsis. Diese ist definiert als SIRS, bei dem Bakterien als auslösendes Pathogen nachgewiesen sind [12]. Im Rahmen der Vergleichsstudie zwischen CASP und CLP wurden deshalb Bakterienkulturen von verschiedenen Organen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 18 Stunden nach OP angefertigt. Hier zeigte sich, dass die Bakterienzahlen nach CASP jederzeit höher sind als nach CLP. Dabei steigt die Zahl der Bakterien bei der CASP in allen gemessenen Organsystemen kontinuierlich mit der Zeit an, sieht man einmal von der Lunge ab, wobei dem Rückgang hier nicht zu großes Gewicht beigemessen werden sollte, da der Wert nach 18 Stunden immer noch sehr hoch ist. Dieser treppenförmige Verlauf kann nach CLP(2) nur in bestimmten Organen beobachtet werden, nämlich in der Peritoneallavage, der Leber und im Blut. Dabei ist folgendes zu beachten: Die Lavage wird unmittelbar am Ort des septischen Fokus, nämlich im Peritoneum, gewonnen, durch die Leber fließt sämtliches Blut aus den Gedärmen ab, und Blut gelangt durch die Hyperämie direkt in das entzündete Gebiet. Das heißt, die Kulturen, die quasi aus der unmittelbaren Nähe der CLP gewonnen wurden, sind positiv und vollziehen besagten treppenförmigen Verlauf. In den Organen, die anatomisch gesehen weiter entfernt liegen vom Fokus der CLP, nämlich Milz, Nieren und Lunge, lassen sich dagegen zu keinem Zeitpunkt nennenswerte Bakterienzahlen nachweisen. Dies bedeutet, dass die CASP, der Definition von Sepsis entsprechend [12], eine deutlich größere septische Potenz besitzt.

Der letzte Teil der Experimente zum Vergleich CASP vs. CLP bestand in der Untersuchung von postoperativen Zytokinspiegeln im Serum mittels ELISA. Ausgewählt waren die klassischen proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , um die systemisch inflammatorische Wirkung der Modelle beurteilen zu können sowie das derzeit kontrovers diskutierte IL-10, für das aber in jedem Fall eine wichtige Rolle hinsichtlich des Überlebens einer Sepsis gezeigt werden konnte [29, 43].

Die Messung von TNF- α ergab für die CLP minimal erhöhte Werte gegenüber der Sham-OP bis 18 Stunden nach OP, ehe TNF- α nach 24 Stunden leicht ansteigt. Dabei ist der Anstieg

nach CLP(2) deutlicher als nach CLP(1). Bei der CASP ist bereits 6 Stunden nach OP ein erheblicher TNF- α -Wert zu verzeichnen, der über 12 bis hin zu 18 Stunden nach OP kontinuierlich steigt.

TNF- α ist gewissermaßen das klassische proinflammatorische Zytokin, das auf bakteriellen Reiz hin hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird. Es löst Fieber aus, rekrutiert immunkompetente Zellen und verstärkt die Immunantwort [24, 27, 50, 54]. Der kontinuierliche und deutliche Anstieg von TNF- α im Serum nach CASP ist also als Beleg dafür zu werten, dass mit der CASP tatsächlich schon bald nach OP eine massive Immunantwort ausgelöst wird. Bei der CLP ist erst nach 24 Stunden ein Anstieg von TNF- α zu sehen, bis dahin „dümpelt“ die Entzündung vor sich hin, ohne große Auswirkung auf systemische Parameter.

Ein ganz ähnliches Ergebnis ergab die Bestimmung von IL-1 β , das neben TNF- α eine Hauptrolle auf der proinflammatorischen Seite der Immunantwort einnimmt. IL-1 β ist ebenfalls ein primär freigesetztes Zytokin, das die Entzündung in synergistischer Wirkung mit TNF- α kräftig ankurbelt [23, 25, 26, 79]. Für IL-1 β zeigt sich nach CASP dementsprechend ein analoges Bild zum TNF- α -Spiegel, nämlich ein bereits nach 6 Stunden beginnender, treppenförmig ansteigender Verlauf. Bei beiden Varianten der CLP hingegen ist auch nach 24 Stunden noch kein merklich erhöhter Wert von IL-1 β zu messen.

IL-10 wird als antiinflammatorisches Zytokin angesehen, das eine überschüssige proinflammatorische Reaktion eindämmen kann, indem es unter anderem die Synthese von IL-1 β und TNF- α hemmt und deren Wirkung antagonisiert [40, 45, 47, 57].; allerdings gibt es inzwischen Daten, die dafür sprechen, dass IL-10 auch proinflammatorische Funktionen hat [29, 43]. In jedem Fall gehört IL-10 zu den wichtigen Mediatoren der Immunantwort.

Die Messungen ergaben für die CLP-Varianten erst nach 24 Stunden einen Anstieg des Wertes, der allerdings plötzlich, und im Falle der CLP(2) sehr massiv, auftritt. Für die CASP gilt auch hier der treppenförmige Verlauf, der, von einem hohen Wert nach 6 Stunden ausgehend, bis 18 Stunden nach OP noch weiter ansteigt. Die Messungen von IL-10 bestätigen also den Eindruck, dass sich eine wirkliche, massive und systemische Entzündung bei der CLP erst zu einem merklich späteren Zeitpunkt einstellt als dies bei der CASP der Fall ist, wo schon 6 Stunden nach OP eine erhebliche systemische Inflammation vorliegt.

Betrachtet man alle durchgeführten Ex-Vivo-Analysen, so ergibt sich für die CASP ein einheitliches Bild. In allen Assays sind 6 Stunden nach der OP bereits merkliche Auswirkungen der Entzündung zu sehen, die sich, passend zum kontinuierlichen Austritt von Stuhl aus dem Stent, fortlaufend steigern im weiteren Verlauf. Mittels Histologie,

Bakteriologien von Lunge und Nieren, sowie der Serumzytokine konnte mehrfach gezeigt werden, dass die CASP eindeutig ein systemisch stattfindendes Krankheitsbild nach sich zieht. In der Vergangenheit wurde die systemische Entzündungsreaktion nach CASP auch auf RNA-Ebene dokumentiert. So steigen die mRNA-Spiegel von TNF- α und IFN- γ in der Lunge deutlich an [90], ferner wurden in der Lunge erhöhte mRNA-Werte für die Chemokine MIP-1 α , MIP-2, IP-10 und MCP-1 [61] gemessen. Und auch in der Niere gelang nach CASP der Nachweis hoher mRNA-Spiegel für IP-10, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 und RANTES [53]. Somit gilt für die CASP: Ausgehend vom ins Colon ascendens implantierten Stent, lösen die kontinuierlich freigesetzten Bakterien zunächst eine fulminante Peritonitis aus, die übergeht in eine schwere systemische Sepsis, welche schließlich zum Tod des Tieres durch Multi-Organversagen (MODS) führt. Dies bedeutet, dass die CASP den vielfach beschriebenen typischen Verlauf einer systemischen Sepsis nachvollzieht [1, 9, 20, 71]. Anhand der Überlebenskinetiken konnte gezeigt werden, dass in der CASP Schwere und Letalität der Sepsis durch Veränderung der Stentgröße fein abgestuft und variiert werden können. Die Ergebnisse sind dabei wiederholbar, ein von Wichterman als wichtig für ein gutes Sepsismodell geforderter Punkt [86]. 48 Stunden nach CASP hat die Maus die Krankheit entweder überwunden oder ist daran verstorben, Todesfälle zu einem späteren Zeitpunkt treten nicht ein. Ein weiterer wichtiger Punkt des Modells ist die Variante der CASPI [90]. Da die chirurgische Sanierung des septischen Fokus bei postoperativer Peritonitis als wichtiger Teil der Standardtherapie international anerkannt ist [6, 14, 87], ist es umso bedeutsamer, diesen Aspekt in der Grundlagenforschung mittels eines geeigneten Modells berücksichtigen zu können. Dies wird durch die CASPI in hoher Standardisierbarkeit gewährleistet [90]. Somit ist die CASP mit der Variante CASPI als Sepsismodell, besonders für chirurgische Ansätze im Hinblick auf postoperative Sepsis aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz, hervorragend geeignet, Fragestellungen auf diesem Gebiet zu beantworten.

Die Analyse der CLP fällt schwerer, denn insgesamt zeigt dieses Sepsismodell ein uneinheitliches Bild. Es beginnt bereits bei den Überlebenskinetiken, denn auch zu wirklich späten Zeitpunkten nach OP erliegen Tiere plötzlich der CLP, ohne aber vorher klinisch auffällig gewesen zu sein. Zusätzlich erweist sich kein signifikanter Letalitätsunterschied zwischen CLP(1) und CLP(2). Zieht man noch einmal die Überlebenskinetiken von Wichterman [86] und Baker [3] heran, so liegen mit dieser Arbeit dreierlei Kinetiken mit dreierlei Ergebnissen vor, was allein schon für eine gewisse Unberechenbarkeit des Modells spricht. Bei den Ex-Vivo-Analysen konnte zunächst einmal relativ übereinstimmend gezeigt

werden, dass Veränderungen, wenn sie denn vorhanden waren, in der CLP(2) stärker auftraten als in der CLP(1). Weiterhin konnte die CLP in keinem durchgeführten Experiment bis zum Zeitpunkt 18 Stunden nach OP den Beweis erbringen, ein Sepsismodell zu sein, das eine kontinuierliche systemische Reaktion auslöst: Keine Bakterien in Lunge, Nieren und Milz, sowie keinerlei Zytokin-Response im Serum belegen dies. Am ehesten ist die CLP wohl mit einem Abszess vereinbar. Schon bei der OP selber wird das Zökum mittels Ligatur verschlossen. Dadurch wird selbiges von der Blutzufuhr abgeschnitten, was zur sicheren Nekrose der Darmwand führt, eine Tatsache, die früher bereits beschrieben wurde [72]. Durch die Punktion des Zökums wird eine Drainage ins Peritoneum geschaffen, der auch vereinzelt Bakterien folgen, die allerdings nie ausreichen, um die Entzündung systemisch auszudehnen. Man hat den Eindruck, dass sich die Punktionsstellen unmittelbar post punctioem durch kulissenartiges Verschieben der Darmwand und fibrinöse Verklebung wieder verschliessen. Eine leichte Peritonitis ist die Folge, die sich in Histologie, Bakteriologie und Zytokinmessungen niederschlägt, bei zwei Löchern im Zökum etwas mehr als bei einem. Ungefähr 24 Stunden nach OP kommt es bei den meisten Tieren aufgrund der fortschreitenden Nekrose zu einem Aufbrechen der nekrotischen Darmwand im Zökum. Eine plötzliche, massive Bakterienfreisetzung ist die Folge, der Körper wird mit Keimen überschwemmt und die Maus verstirbt nach kurzer, heftiger Krankheit. Damit kann man auch erklären, warum manche CLP-operierten Tiere erst sehr spät post OP versterben: Die Ruptur des intraabdominellen Abszesses findet später statt. In einer jüngst veröffentlichten Arbeit beispielsweise wurde die CLP ganz bewusst zur Evaluierung intraabdomineller Abszessbildung eingesetzt [8].

Somit entspricht die CLP weniger einem Sepsis- als vielmehr einem Abszessmodell. Die CASP dagegen ist ein echtes Sepsismodell, das die klinische Situation eines SIRS aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz eindrucksvoll simuliert. Das bedeutet aber, dass die beiden Modelle streng voneinander zu unterscheiden sind. Dementsprechend muss sich die Wahl des Modells strikt an der zu untersuchenden Fragestellung orientieren. Die CLP sollte als Abszessmodell gesehen und künftig einzig vor diesem Hintergrund verwendet werden. Für allgemeine Sepsisforschung hingegen ist die CASP aufgrund der eindeutigen Datenlage und der guten Berechenbarkeit als Modell der Wahl zu betrachten. Denn das Krankheitsbild der systemischen Sepsis ist eigenständig und unterscheidet sich grundlegend von dem des intraabdominellen Abszesses.

7 Zusammenfassung

Ein gutes Tiermodell ist Voraussetzung, um relevante und verwertbare Ergebnisse bei der Erforschung immunologischer Zusammenhänge in der Sepsis zu bekommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei operative Sepsismodelle in der Maus, die „Cecal Ligation and Puncture“ (CLP) und die „Colon Ascendens Stent Peritonitis“ (CASP), miteinander verglichen. Bei der CLP wird das Zökum der Maus ligiert und anschließend punktiert. Im Modell der CASP implantiert man einen Stent in das Colon Ascendens der Maus, der eine Verbindung zwischen Darmlumen und Peritoneum schafft. Beide Varianten sollen im Versuchstier das klinische Bild einer fulminanten Sepsis hervorrufen.

Zunächst wurden innerhalb des jeweiligen Modells Überlebenskinetiken angefertigt. Die CLP wurde als CLP mit einfacher 18G-Punktion (CLP(1)) sowie mit zweifacher 18G-Punktion (CLP(2)) operiert. Für die CASP wurden drei verschiedene Stentgrößen verwendet, nämlich 14G, 16G und 18G. Das Ergebnis zeigte im Falle der CASP eine feine Abstufung der Letalität nach 48 Stunden, abhängig von der verwendeten Stentgröße. Bei der CLP war die Kinetik erst nach 192 Stunden endgültig abgeschlossen und ergab keinen Unterschied im Überleben zwischen den beiden Varianten.

In den folgenden Ex-Vivo-Experimenten wurden CLP(1), CLP(2), 14G-CASP, 16G-CASP und eine Sham-OP miteinander verglichen.

Die Entwicklung einer Peritonitis wurde zunächst makroskopisch mittels Fotodokumentation des Situs 24 Stunden nach entsprechender OP überprüft. Bei CLP(1) und CLP(2) imponierte ein völlig avitales Zökum nebst lokaler Entzündung, während bei CASP das gesamte Peritoneum deutlich entzündet war. Zur mikroskopischen Beurteilung wurde proximales Jejunum 6, 12 und 18 Stunden nach OP HE- und immunohistochemisch gefärbt. Dabei ergab sich für die CASP ein kontinuierlich zunehmendes Bild von Destruktion und Infiltration, Sham und CLP(1) zeigten praktisch keine Veränderungen im Jejunum, CLP(2) präsentierte sich uneinheitlich.

Bakteriologische Untersuchungen veranschaulichten die Tatsache, dass ein massiver Bakterienbefall des gesamten Organismus nur nach CASP gewährleistet ist. CLP vermag lediglich eine Infektion anatomisch dem Fokus nahegelegener Organe zu bewirken.

Mittels ELISA wurde die Entwicklung der Serumspiegel von TNF- α , IL-1 β und IL-10 bis 18 Stunden nach CASP bzw. bis 24 Stunden nach CLP beobachtet. Es zeigte sich bei CASP in allen drei Fällen ein starker, kontinuierlicher Anstieg der Werte, während nach CLP(2) nur

der 24-Stunden Wert von IL-10 sehr hoch war. Alle übrigen Werte nach CLP(1) und CLP(2) bewegten sich auf konstant niedrigem Niveau.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich binnen 48 Stunden nach CASP kontinuierlich eine den gesamten Organismus erfassende, fulminante Sepsis entwickelt. Desweiteren ist die Letalität nach CASP durch Variation der Stentgröße exakt abstufbar, auch die Wiederholbarkeit der CASP ist gewährleistet. Im Gegensatz dazu bescheinigen die Versuche der CLP vor allem eine diskontinuierliche Entwicklung. Vom Modell her praktisch schon als Abszess zu sehen, erfüllt die CLP auch klinische Kriterien eines schwelenden Abszessherdes, der rupturieren kann, aber nicht muss. Die gewonnenen Ex-Vivo-Daten unterstützen diese These. Während die CASP, die mit der Variante CASPI außerdem die Möglichkeit der Fokussanierung bietet, als echtes Sepsismodell anzusehen ist, sollte die CLP künftig eher als Abszessmodell bezeichnet und unter diesem Gesichtspunkt auch verwendet werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Adrie, C., Pinsky, M. R. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med* 26 (2000) 364-375.
2. Ahrenholz, D. H., Simmons, R. L. Fibrin in peritonitis. I. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. coli* peritonitis. *Surgery* 88 (1980) 41-47.
3. Baker, C. C., Chaudry, I. H., Gaines, H. O., Baue, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94 (1983) 331-335.
4. Baker, C. C., Huynh, M. D. Sepsis in the critically ill patient. *Curr Probl Surg* 32 (1995) 1013-1083.
5. Bartels, H., Siewert, J. R. [The role of antibiotic therapy for postoperative infectious complications]. *Klin Wochenschr* 69 (1991) 53-56.
6. Bartels, H., Stadler, J., Barthlen, W., Miedtke, T., Siewert, J. R. [Causes of organ failure in infection]. *Zentralbl Chir* 119 (1994) 168-174
7. Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Louie, T., Kasper, D. L., Gorbach, S. L. A review. Lessons from an animal model of intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 113 (1978) 853-857.
8. Bedirli, A., Gokahmetoglu, S., Sakrak, O., Ersoz, N., Ayangil, D., Esin, H. Prevention of intraperitoneal adhesion formation using beta-glucan after ileocolic anastomosis in a rat bacterial peritonitis model. *Am J Surg* 185 (2003) 339-343.
9. Bellingan, G. Inflammatory cell activation in sepsis. *Br Med Bull* 55 (1999) 12-29
10. Beutler, B., Cerami, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7 (1989) 625-655
11. Bone, R. C. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115 (1991) 457-469.
12. Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., Sibbald, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 (1992) 1644-1655.
13. Borden, C. W., Hall, W. H. Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *N Engl J Med* 245 (1951) 760
14. Bosscha, K., Van Vroonhoven, T. J., Van Der Werken, C. Surgical management of severe secondary peritonitis. *Br J Surg* 86 (1999) 1371-1377.
15. Braude, A. I., Siemienski, J., Williams, D., Sanford, J. Overwhelming bacteremic shock produced by gram-negative bacilli. A report of four cases with one recovery. *Univ Mich Bull* 19 (1953) 23
16. Browne, M. K., Leslie, G. B. Animal models of peritonitis. *Surg Gynecol Obstet* 143 (1976) 738-740.

17. Cameron, D. E., Chaudry, I. H., Schleck, S., Baue, A. E. Hepatocellular dysfunction in early sepsis despite increased hepatic blood flow. *Adv Shock Res* 6 (1981) 65-74
18. Carroll, G. C., Snyder, J. V. Hyperdynamic severe intravascular sepsis depends on fluid administration in cynomolgus monkey. *Am J Physiol* 243 (1982) R131-141.
19. Clowes, G. H., Jr., Zuschneid, W., Turner, M., Blackburn, G., Rubin, J., Toala, P., Green, G. Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infections in other parts of the body. *Ann Surg* 167 (1968) 630-650.
20. Davies, M. G., Hagen, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 84 (1997) 920-935.
21. Decker, G. A., Daniel, A. M., Blevings, S., Maclean, L. D. Effect of peritonitis on mitochondrial respiration. *J Surg Res* 11 (1971) 528-532.
22. Dehring, D. J., Crocker, S. H., Wismar, B. L., Steinberg, S. M., Lowery, B. D., Cloutier, C. T. Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure. *J Surg Res* 34 (1983) 151-158.
23. Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (1996) 2095-2147.
24. Dinarello, C. A. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* 11 (1997) 91-103.
25. Dinarello, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856 (1998) 1-11.
26. Dinarello, C. A. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 343 (2000) 732-734.
27. Dinarello, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 (2000) 503-508.
28. Emerson, T. E., Jr., Gill, C. C. Effects of slow intravenous endotoxin infusion on hemodynamics and survival in dogs. *J Appl Physiol* 22 (1967) 874-877.
29. Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X. X., Hancock, W. W., Holzmann, B., Heidecke, C. D. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol* 167 (2001) 3919-3927.
30. Fink, M. P., Macvittie, T. J., Casey, L. C. Inhibition of prostaglandin synthesis restores normal hemodynamics in canine hyperdynamic sepsis. *Ann Surg* 200 (1984) 619-626.
31. Fink, M. P., Fiallo, V., Stein, K. L., Gardiner, W. M. Systemic and regional hemodynamic changes after intraperitoneal endotoxin in rabbits: development of a new model of the clinical syndrome of hyperdynamic sepsis. *Circ Shock* 22 (1987) 73-81
32. Fink, M. P., Heard, S. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49 (1990) 186-196.
33. Fish, R. E., Spitzer, J. A. Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious, unrestrained rat: a unique model of chronic endotoxemia. *Circ Shock* 12 (1984) 135-149

34. Fisher, C. J., Jr., Agosti, J. M., Opal, S. M., Lowry, S. F., Balk, R. A., Sadoff, J. C., Abraham, E., Schein, R. M., Benjamin, E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334 (1996) 1697-1702.
35. Guirao, X., Garcia-Domingo, M., Llado, L., Franch-Arcas, G., Oliva, A., Munoz, A., Sitges-Serra, A. A new model of intraabdominal abscess: usefulness for hydrosaline metabolism studies in parenteral nutrition associated with sepsis. *J Surg Res* 59 (1995) 658-665.
36. Hangen, D. H., Bloom, R. J., Stevens, J. H., O'hanley, P., Ranchod, M., Collins, J., Raffin, T. A. Adult respiratory distress syndrome. A live E coli septic primate model. *Am J Pathol* 126 (1987) 396-400.
37. Haybron, D. M., Townsend, M. C., Hampton, W. W., Schirmer, J. M., Fry, D. E. Effective renal blood flow and renal energy charge in murine peritonitis. *Am Surg* 52 (1986) 625-629
38. Hermreck, A. S., Thal, A. P. Mechanisms for the high circulatory requirements in sepsis and septic shock. *Ann Surg* 170 (1969) 677-695.
39. Hermreck, A. S., Berg, R. A., Ruhlen, J. R., Macarthur, R. I. Renal response in sepsis. *Arch Surg* 107 (1973) 169-175.
40. Huber, T. S., Gaines, G. C., Welborn, M. B., 3rd, Rosenberg, J. J., Seeger, J. M., Moldawer, L. L. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock* 13 (2000) 425-434.
41. Imamura, M., Clowes, G. H., Jr. Hepatic blood flow and oxygen consumption in starvation, sepsis and septic shock. *Surg Gynecol Obstet* 141 (1975) 27-34.
42. Johnston, T. D., Hampton, W. W., Fry, D. E. Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg* 46 (1989) 101-103.
43. Kalechman, Y., Gafter, U., Gal, R., Rushkin, G., Yan, D., Albeck, M., Sredni, B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol* 169 (2002) 384-392
44. Kim, P. K., Deutschman, C. S. Inflammatory responses and mediators. *Surg Clin North Am* 80 (2000) 885-894.
45. Kumar, A., Creery, W. D. The therapeutic potential of interleukin 10 in infection and inflammation. *Arch Immunol Ther Exp* 48 (2000) 529-538
46. Kurtz, H. J., Quast, J. Effects of continuous intravenous infusion of Escherichia coli endotoxin into swine. *Am J Vet Res* 43 (1982) 262-268.
47. Lalani, I., Bhol, K., Ahmed, A. R. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79 (1997) 469-483.
48. Lanoue, K. F., Mason, A. D., Jr., Daniels, J. P. The impairment of glucogenesis by gram negative infection. *Metabolism* 17 (1968) 606-611.
49. Law, W. R., Ferguson, J. L. Naloxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats. *Am J Physiol* 255 (1988) H1106-1113.

50. Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (2001) 487-501.
51. Lukacs, N. W., Hogaboam, C., Campbell, E., Kunkel, S. L. Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chem Immunol* 72 (1999) 102-120
52. Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338 (1998) 436-445.
53. Maier, S., Emmanuilidis, K., Entleutner, M., Zantl, N., Werner, M., Pfeffer, K., Heidecke, C. D. Massive chemokine transcription in acute renal failure due to polymicrobial sepsis. *Shock* 14 (2000) 187-192.
54. Mannel, D. N., Echtenacher, B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 74 (2000) 141-161
55. Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Evanoff, H. L., Kunkel, S. L. Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response. *J Immunol* 164 (2000) 5362-5368
56. Mohler, K. M., Torrance, D. S., Smith, C. A., Goodwin, R. G., Stremmer, K. E., Fung, V. P., Madani, H., Widmer, M. B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151 (1993) 1548-1561.
57. Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 683-765
58. Nakatani, T., Sato, T., Marzella, L., Hirai, F., Trump, B. F., Siegel, J. H. Hepatic and systemic metabolic responses to aerobic and anaerobic intra- abdominal abscesses in a highly reproducible chronic rat model. *Circ Shock* 13 (1984) 271-294
59. Natanson, C., Fink, M. P., Ballantyne, H. K., Macvittie, T. J., Conklin, J. J., Parrillo, J. E. Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J Clin Invest* 78 (1986) 259-270.
60. Natanson, C., Danner, R. L., Fink, M. P., Macvittie, T. J., Walker, R. I., Conklin, J. J., Parrillo, J. E. Cardiovascular performance with E. coli challenges in a canine model of human sepsis. *Am J Physiol* 254 (1988) H558-569.
61. Neumann, B., Zantl, N., Veihelmann, A., Emmanuilidis, K., Pfeffer, K., Heidecke, C. D., Holzmann, B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 11 (1999) 217-227.
62. Onderdonk, A. B., Weinstein, W. M., Sullivan, N. M., Bartlett, J. G., Gorbach, S. L. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun* 10 (1974) 1256-1259.
63. Onderdonk, A. B., Bartlett, J. G., Louie, T., Sullivan-Seigler, N., Gorbach, S. L. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect Immun* 13 (1976) 22-26.
64. Parker, S. J., Watkins, P. E. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 88 (2001) 22-30.

65. Pass, L. J., Schloerb, P. R., Pearce, F. J., Drucker, W. R. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia. *Am J Physiol* 246 (1984) H344-350.
66. Perbellini, A., Shatney, C. H., Maccarter, D. J., Lillehei, R. C. A new model for the study of septic shock. *Surg Gynecol Obstet* 147 (1978) 68-74.
67. Perkash, I., Satpati, P., Agarwal, K. C., Chakravarti, R. N., Chhuttani, P. N. Prolonged peritoneal lavage in fecal peritonitis. *Surgery* 68 (1970) 842-845.
68. Pitcairn, M., Schuler, J., Erve, P. R., Holtzman, S., Schumer, W. Glucocorticoid and antibiotic effect on experimental gram-negative bacteremic shock. *Arch Surg* 110 (1975) 1012-1015.
69. Postel, J., Schloerb, P. R., Furtado, D. Pathophysiologic alterations during bacterial infusions for the study of bacteremic shock. *Surg Gynecol Obstet* 141 (1975) 683-692.
70. Postel, J., Schloerb, P. R. Metabolic effects of experimental bacteremia. *Ann Surg* 185 (1977) 475-480.
71. Quezado, Z. M., Natanson, C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. *Am J Kidney Dis* 20 (1992) 214-222.
72. Reijnen, M. M., Meis, J. F., Postma, V. A., Van Goor, H. Prevention of intra-abdominal abscesses and adhesions using a hyaluronic acid solution in a rat peritonitis model. *Arch Surg* 134 (1999) 997-1001.
73. Richmond, J. M., Walker, J. F., Avila, A., Petrakis, A., Finley, R. J., Sibbald, W. J., Linton, A. L. Renal and cardiovascular response to nonhypotensive sepsis in a large animal model with peritonitis. *Surgery* 97 (1985) 205-214.
74. Ryan, N. T., Blackburn, G. L., Clowes, H. A., Jr. Differential tissue sensitivity to elevated endogenous insulin levels during experimental peritonitis in rats. *Metabolism* 23 (1974) 1081-1089.
75. Sato, T., Isoyama, T., Tanaka, J., Jones, R. T., Cowley, R. A., Trump, B. F. The pathophysiology of septic shock: changes in hemodynamics in rats following live E coli injection. An application of the thermodilution method for measurement of cardiac output. *Adv Shock Res* 7 (1982) 25-42
76. Schaer, G. L., Fink, M. P., Chernow, B., Ahmed, S., Parrillo, J. E. Renal hemodynamics and prostaglandin E2 excretion in a nonhuman primate model of septic shock. *Crit Care Med* 18 (1990) 52-59.
77. Sleeman, H. K., Diggs, J. W., Hayes, D. K., Hamit, H. F. Value of antibiotics, corticosteroids, and peritoneal lavage in the treatment of experimental peritonitis. *Surgery* 66 (1969) 1060-1066.
78. Slotman, G. J., Burchard, K. W., Williams, J. J., D'arezzo, A., Yellin, S. A. Interaction of prostaglandins, activated complement, and granulocytes in clinical sepsis and hypotension. *Surgery* 99 (1986) 744-751.
79. Stylianou, E., Saklatvala, J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 30 (1998) 1075-1079.
80. Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Muller, J. M., Docke, W. D., Kox, W. J. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 22 Suppl 4 (1996) S474-481.

81. Wade, S., Bussow, M., Hanisch, E. [Epidemiology of systemic inflammatory response syndrome, infection and septic shock in surgical intensive care patients]. *Chirurg* 69 (1998) 648-655.
82. Waisbren, B. A. Gram-negative shock and endotoxin shock. *Am J Med* 36 (1964) 819
83. Walker, H. L., Mason, A. D., Jr., Raulston, G. L. Surface infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Surg* 160 (1964) 297
84. Warren, H. S. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 336 (1997) 952-953.
85. Weinstein, W. M., Onderdonk, A. B., Bartlett, J. G., Gorbach, S. L. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. *Infect Immun* 10 (1974) 1250-1255.
86. Wichterman, K. A., Baue, A. E., Chaudry, I. H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29 (1980) 189-201.
87. Wittmann, D. H., Schein, M., Condon, R. E. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 224 (1996) 10-18.
88. Wright, C. J., Duff, J. H., Mclean, A. P., Maclean, L. D. Regional capillary blood flow and oxygen uptake in severe sepsis. *Surg Gynecol Obstet* 132 (1971) 637-644.
89. Zantl, N., Holzmann, B., Pfeffer, K., Heidecke, C. D. Colon ascendens stent peritonitis (CASP): a novel surgical model for the induction of bacterial peritonitis/sepsis in mice. In "4th international congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis. Mechanisms and therapeutic approaches", Faist, E. (Ed.), Monduzzi Editore S.p.A., Bologna, 1997, 467-471.
90. Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J. R., Holzmann, B., Heidecke, C. D., Pfeffer, K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 66 (1998) 2300-2309.

9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1a: Inzision der Bauchhaut	20
Abb. 1b: Bauchmuskel durchtrennt	20
Abb. 1c: Aufsuchen des Zökalspols	21
Abb. 1d: Herausschwenken des Zökums.....	21
Abb. 1e: Ligatur mit Ethilon 5/0.....	21
Abb. 1f: Ligiertes Zökum	21
Abb. 1g: 18G-Kanüle	22
Abb. 1h: Punktion des Zökums.....	22
Abb. 1i: 2. Punktion	22
Abb. 1j: Zweifach punktiertes Zökum	22
Abb. 1k: Reposition des Zökums	22
Abb. 1l: Applikation von 0,5 ml NaCl	22
Abb. 1m: Verschluss des Bauchmuskels	23
Abb. 1n: Hautnaht.....	23
Abb. 2a: Einritzen des Plastikmantels.....	24
Abb. 2b: Katheter mit Kerbe	24
Abb. 2c: Inzision der Haut.....	24
Abb. 2d: Durchtrennen der Linea alba	24
Abb. 2e: Freilegen des Zökums	24
Abb. 2f: Ausschwenken des C. ascendens	24
Abb. 2g: Durchstich mit 7/0.....	25
Abb. 2h: Chirurgicaler Knoten	25
Abb. 2i: Punktion des Colons	25
Abb. 2j: vorgeschobener Katheter	25
Abb. 2k: Chir. Knoten auf die Kerbe	25
Abb. 2l: Katheter, einfach fixiert.....	25
Abb. 2m: Durchstechung der Darmwand	26
Abb. 2n: Chir. Knoten	26
Abb. 2o: Katheter, zweifach fixiert.....	26
Abb. 2p: Abschneiden der Fäden.....	26
Abb. 2q: Zurückziehen des Mandrins	26
Abb. 2r: Abschneiden des Katheters	26
Abb. 2s: Stent, mit Faeces gefüllt	27
Abb. 2t: Reposition in die Bauchhöhle	27
Abb. 2u: Applikation von 0,5 ml NaCl	27
Abb. 2v: Naht des Bauchmuskels.....	27
Abb. 2w: Hautnaht	27
Abb. 3: Auflistung der OP-Gruppen	35
Abb. 4a: Überleben nach CLP abhängig von der Anzahl der Punktionen	36
Abb. 4b: Überleben nach CASP abhängig von der Stentgröße	37
Abb. 5a: Sham-OP.....	38
Abb. 5b: CLP(1)	38
Abb. 5c: CLP(2).....	38
Abb. 5d: CASP.....	38
Abb. 6a: Sham, 6h, HE.....	39
Abb. 6b: CLP(1), 6h, HE	39
Abb. 6c: CLP(2), 6h, HE	39
Abb. 6d: CASP, 6h, HE.....	39
Abb. 7a: Sham, 12h, HE.....	40
Abb. 7b: CLP(1), 12h, HE	40

Abb. 7c: CLP(2), 12h, HE	40
Abb. 7d: CASP, 12h, HE.....	40
Abb. 8a: Sham, 18h, HE.....	40
Abb. 8b: CLP(1), 18h, HE	40
Abb. 8c: CLP(2), 18h, HE	41
Abb. 8d: CASP, 18h, HE.....	41
Abb. 9a: Sham, 6h, Gr-1	41
Abb. 9b: CLP(1), 6h, Gr-1	41
Abb. 9c: CLP(2), 6h, Gr-1	42
Abb. 9d: CASP, 6h, Gr-1	42
Abb. 10a: Sham, 12h, Gr-1	42
Abb. 10b: CLP(1), 12h, Gr-1	42
Abb. 10c: CLP(2), 12h, Gr-1	42
Abb. 10d: CASP, 12h, Gr-1	42
Abb. 11a: Sham, 18h, Gr-1	43
Abb. 11b: CLP(1), 18h, Gr-1	43
Abb. 11c: CLP(2), 18h, Gr-1	43
Abb. 11d: CASP, 18h, Gr-1	43
Abb. 12a: Sham, 6h, Mac-1	44
Abb. 12b: CLP(1), 6h, Mac-1	44
Abb. 12c: CLP(2), 6h, Mac-1.....	44
Abb. 12d: CASP, 6h, Mac-1.....	44
Abb. 13a: Sham, 12h, Mac-1	45
Abb. 13b: CLP(1), 12h, Mac-1	45
Abb. 13c: CLP(2), 12h, Mac-1.....	45
Abb. 13d: CASP, 12h, Mac-1.....	45
Abb. 14a: Sham, 18h, Mac-1	45
Abb. 14b: CLP(1), 18h, Mac-1	45
Abb. 14c: CLP(2), 18h, Mac-1.....	46
Abb. 14d: CASP, 18h, Mac-1.....	46
Abb. 15: Bakteriologie der Peritoneallavage	47
Abb. 16: Bakteriologie der Leber	48
Abb. 17: Bakteriologie der Milz.....	49
Abb. 18: Bakteriologie der Nieren	50
Abb. 19: Bakteriologie der Lunge.....	51
Abb. 20: Bakteriologie des Blutes	52
Abb. 21a: TNF- α nach Sham-OP	53
Abb. 21b: TNF- α nach CLP(1).....	53
Abb. 21c: TNF- α nach CLP(2).....	53
Abb. 21d: TNF- α nach CASP	53
Abb. 22a: IL-1 β nach Sham-OP	54
Abb. 22b: IL-1 β nach CLP(1).....	54
Abb. 22c: IL-1 β nach CLP(2)	54
Abb. 22d: IL-1 β nach CASP.....	54
Abb. 23a: IL-10 nach Sham-OP	55
Abb. 23b: IL-10 nach CLP(1).....	55
Abb. 23c: IL-10 nach CLP(2)	55
Abb. 23d: IL-10 nach CASP	55

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die Unterstützung und Hilfe, die mir von vielen Seiten zuteil wurde, nicht realisiert werden können.

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke, der das Thema gestellt und die Arbeit als Dissertation angenommen hat, desweiteren Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer und Prof. Dr. med. Bernhard Holzmann für die Bereitstellung der nötigen Infrastruktur sowie vor allem auch meinem Betreuer, Dr. med. Stefan Maier, der mit zahlreichen Anregungen den Fortgang der Arbeit gefördert hat.

Für beständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in technischen Fragen danke ich Felicitas Altmeyer, Volker Aßfalg, Dr. med. Markus Entleutner, Dr. rer. nat. Caroline Feterowski, Dr. med. Klaus Erich Gerauer, Norbert Hüser, Simone Kaiser-Moore, Martina Rump, Stefanie Scheu, Sylvia Schlautkötter, Tanja Walsh, PD Dr. med. Heike Weighardt und Steffen Wurzbacher.

Ein besonderes Wort des Dankes gilt nicht zuletzt Tanja Roßmann-Bloeck, ohne deren außerordentliches und unermüdliches Engagement diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.