

Aus der
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Claus-Dieter Heidecke)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Auswirkungen einer Peritoneallavage mit Polihexanid-Lipofundin[®]-Emulsion auf die abdominelle Sepsis im murinen Sepsismodell CASPI



Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2020

vorgelegt von:
Christoph Sandbrink
geb. am: 25.11.1986
in: Münster

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: PD Dr. med. Wolfram Keßler
2. Gutachter: PD Dr. med. Andreas Hecker
Ort, Raum: Online Meeting
Tag der Disputation: 01.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	7
1.1 Sepsis	7
1.1.1 Definition	7
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Pathophysiologie	9
1.2 Abdominelle Sepsis	10
1.2.1 Einteilung	11
1.2.2 Erregerspektrum	12
1.2.3 Therapie	12
1.2.4 Tiermodelle	14
1.3 Antiseptika	16
1.3.1 Povidon-Iod	16
1.3.2 Octenidin	17
1.3.3 Taurolidin	18
1.3.4 Polihexanid	18
1.3.5 Polihexanid + Lipofundin®	19
2 Fragestellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Versuchsgruppen	21
3.2 Verwendetes Material	22
3.3 Methodik in vivo	24
3.3.1 Tiermodell	24
3.3.2 Überlebenskinetik	27
3.3.3 Probengewinnung	27
3.4 Methodik ex vivo	28
3.4.1 Bakteriologie	28
3.4.2 Analyse der Zytokinspiegel	28
3.4.3 Blutbild	30
3.4.4 Klinische Chemie	30
3.5 Verblindung und Randomisierung	30
3.6 Statistische Auswertung	31

Inhaltsverzeichnis

4	Ergebnisse	32
4.1	Überlebenskinetik	32
4.2	Bakteriologie	33
4.3	Zytokinspiegel	36
4.4	Blutbild	37
4.5	Klinische Chemie	39
5	Diskussion	40
6	Zusammenfassung	47
	Literatur	48
	Anhang	56
1	Kongressbeiträge / Veröffentlichungen	56
2	Belastungsscore	57
	Eidesstattliche Erklärung	58
	Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

CARS Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome

CASP Colon Ascendens Stent Peritonitis

CASPI Colon Ascendens Stent Peritonitis mit Intervention

CBA Cytometric Bead Array

CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat

CLP Cecal Ligation and Puncture

DAMP Damage-Associated Molecular Pattern

DIG Disseminierte intravasale Gerinnung

DRG Diagnosis Related Groups

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ESBL Extended-Spectrum Beta-Lactamase

FITC Fluoresceinisothiocyanat

g Erdschwerebeschleunigung

G Gauge

i. p. Intraperitoneal

i. v. Intravenös

IAI Intraabdominelle Infektion

IFN Interferon

IL Interleukin

KbE Koloniebildende Einheiten

KG Körpergewicht

LCT	Long-Chain Triglyceride
LPS	Lipopolysaccharid
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MCT	Medium-Chain Triglyceride
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nuclear Factor- κ B
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PHMB/Polihexanid	Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PRR	Pattern Recognition Receptor
rpm	Revolutions Per Minute
s. c.	Subcutan
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
VAC	Vacuum Assisted Closure

1 Einleitung

Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung einer neuen Lavagelösung zur Therapie der abdominalen Sepsis am murinen Sepsismodell.

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition

Die Definition der Sepsis wurde durch internationale Konsensuskonferenzen festgelegt und zuletzt 2016 revidiert. Erstmals war Sepsis 1992 (Sepsis-1) als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) auf dem Boden einer Infektion definiert und 2001 (Sepsis-2) bestätigt worden [1, 2]. Das SIRS beschreibt eine systemische Reaktion des Körpers, die z. B. bei Infektion, Trauma, thermischem Schaden oder auch steriler Inflammation auftreten kann. Die Diagnose wird gestellt, wenn bei der Untersuchung von Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atmung und Leukozytenzahl mindestens zwei der vier definierten Kriterien vorliegen [1, 2]. Die schwere Sepsis war als Sepsis mit Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension definiert worden [1, 2]. Die Definition des septischen Schocks war als arterielle Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie oder Notwendigkeit einer Vasopressortherapie auf dem Boden einer Sepsis festgelegt worden, die jeweils mit den Zeichen einer inadäquaten Perfusion einhergehen [1, 2].

Auf der internationalen Konsensuskonferenz 2016 wurde die Sepsis neu definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer dysregulierten Wirtsantwort auf eine Infektion (Sepsis-3) [3]. Zur Diagnose der Organdysfunktion wird dabei der Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA)-Score herangezogen. Anhand dessen

werden sechs Organsysteme beurteilt und die jeweilige Einschränkung mit null bis vier Punkten bewertet. Eine Änderung des Scores von größer oder gleich zwei Punkten bzw. ein SOFA-Score von zwei Punkten bei einem unbekanntem Patienten führt zur Diagnose einer Organdysfunktion und ist mit einer Gesamtmortalität von 10 % verbunden [3]. Der septische Schock nach Sepsis-3 ist definiert als Sepsis mit der Notwendigkeit einer Vasopressortherapie zur Erhaltung eines mittleren arteriellen Drucks (MAD) ≥ 65 mmHg und eines Serumlaktats > 2 mmol/l trotz adäquater Volumensubstitution [3]. Bei Vorliegen eines septischen Schocks wird eine Krankenhausmortalität von über 40 % angegeben [3]. Die Definition der schweren Sepsis wurde auf dieser Konsensuskonferenz aufgegeben [3].

1.1.2 Epidemiologie

Da erst 2016 die Sepsisdefinition geändert wurde, beziehen sich die meisten epidemiologischen Daten auf die Sepsis-1 Definition von 1992.

Basierend auf den Daten der deutschen Diagnosis Related Groups (DRG)-Statistik stieg die Anzahl der Sepsisfälle in der Bundesrepublik Deutschland im Zeitraum von 2007–2013 von 200 535 auf 279 530 Fälle pro Jahr und damit um durchschnittlich 5,7 % jährlich an [4]. Die Krankenhaushäufigkeit der Sepsis im Jahr 2013 betrug 335 Fälle pro 100 000 Einwohner [4]. Eine prospektive Observationsstudie, die 2003–2004 an deutschen Intensivstationen durchgeführt wurde, zeigte für die schwere Sepsis eine Inzidenz von 76–110 pro 100 000 Erwachsener [5]. Daten aus den USA belegen einen Anstieg der Inzidenz der schweren Sepsis um 50 % von 2003 bis 2007 [6]. Für die schwere Sepsis wurde dort eine Steigerung der Krankenhauskosten von 15,4 auf 24,3 Milliarden US-Dollar berechnet [6].

Die Krankenhausmortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks nach Sepsis-1-Kriterien in Europa wird in der Literatur mit 36,3–49,6 % angegeben [7–10]. In Deutschland fand die SepNet Gruppe in einer 2013 an 133 Intensivstationen durchgeführten Studie (INSEP) eine Krankenhaussterblichkeit von 40,4 % für Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock nach Sepsis-1-Kriterien [7]. Bei Anwendung der Sepsis-3-Kriterien aus 2016 ergab sich für Patienten mit septischem Schock eine höhere Mortalität

von 50,9 % [7]. Nach einer Studie von Angus et al. aus 2001 war die schwere Sepsis in den USA jährlich Ursache für ebenso viele Todesfälle wie der akute Myokardinfarkt [11].

1.1.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Sepsis stellt einen komplexen und noch nicht abschließend verstandenen Prozess dar.

Hierbei führt eine meist bakterielle Infektion zunächst zu einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems [12]. Konservierte mikrobielle Strukturen, sogenannte Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), wie z. B. Lipopolysaccharid (LPS), das auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien zu finden ist, werden durch Pattern Recognition Receptors (PRRs) erkannt [13]. Diese Rezeptoren befinden sich sowohl auf Zellen der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen und dendritischen Zellen als auch auf Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten [13].

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) transloziert als Folge einer PRR-Aktivierung in den Nukleus und bewirkt u. a. eine vermehrte Transkription proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-12 und IL-18 [14, 15]. Es kommt zur weiteren Expressierung von Zyto- und Chemokinen, Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, Aktivierung des Komplementsystems, der Gerinnungskaskade und des Endothels sowie zur Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) durch neutrophile Granulozyten [15]. Werden die Erreger durch diese Mechanismen beseitigt, kann eine Abheilung erfolgen [16]. Insbesondere bei schweren Infektionen mit ausgedehnter Kontamination kann es jedoch zu einer überschießenden, dysregulierten Immunantwort mit Organschädigung kommen [16].

Zu den häufig auftretenden Organschädigungen zählt die akute Niereninsuffizienz, die mit einer erhöhten Mortalität einhergeht [17]. Studien weisen darauf hin, dass Inflammation und Apoptose neben renaler Hypotension und damit verbundener Ischämie eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen [18]. Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) führt zunächst zu einer Hyperkoagulabilität und später zur Verbrauchskoagulopathie mit entsprechenden Schäden durch Thromboembolien und Mikrozirkulationsstö-

rungen bzw. durch Blutungen [19]. Auslöser im Rahmen der Sepsis ist eine vermehrte Expression von tissue factor [20]. Dies führt zu einem circulus vitiosus, da Thrombin u. a. über Zytokine und Aktivierung des Komplementsystems proinflammatorisch wirkt, Zytokine andererseits prokoagulatorisch wirken [20]. Die Aktivierung von PRRs auf Kardiomyozyten, erhöhte Zytokinspiegel im Blut sowie die vermehrte Stickoxidproduktion durch aktiviertes koronares Endothel sind einige bekannte Ursachen, die zur septischen Kardiomyopathie führen [21]. Die vorgenannten Mechanismen stellen nur einen kurzen Überblick über einige Pathomechanismen ausgewählter Organschädigungen dar.

Eine weitere Gruppe von Molekülen, die PRRs aktivieren, werden als Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) oder Alarmine bezeichnet [22]. Sie werden bei zellulärer Schädigung freigesetzt [22]. Dies trägt einerseits zur Zunahme der systemischen Entzündungsreaktion im Rahmen der Sepsis bei, andererseits wird dadurch das Auftreten eines SIRS ohne infektiösen Fokus z. B. bei schwerem Trauma erklärt [15, 23].

Im Rahmen der Sepsis kann als Folge der Hyperinflammation durch zeitgleiche Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 ein Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome (CARS) entstehen [24]. Durch vermehrte Apoptose von Immunzellen und die Funktionsbeeinträchtigung der Neutrophilen- und Monozytenfunktion entsteht eine Immunparalyse [24].

In der akuten Phase der Sepsis versterben Patienten infolge der Hyperinflammation mit resultierender Organschädigung häufig im Multiorganversagen [25]. Die Ursachen für das Versterben in der späten Phase der Sepsis sind noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden eine persistierende Immunsuppression mit rezidivierenden Entzündungen sowie eine persistierende Inflammation mit fortschreitender Organschädigung [25].

1.2 Abdominelle Sepsis

Intraabdominelle Infektionen sind nach Infektionen der unteren Atemwege die zweithäufigste Ursache für eine Sepsis [5, 7, 26–29]. In einer internationalen Multicenterstudie (EPIC II) wurden im Jahr 2007 Daten von Patienten auf Intensivstationen erhoben [30].

Eine Auswertung dieser Daten zeigte, dass Patienten mit einer abdominellen Infektion eine höhere Krankenhausmortalität gegenüber Patienten mit anderen Infektionen aufwiesen (36,3 % vs. 32,3 %) [30].

Die häufigsten Foci der abdominellen Sepsis stellen Appendix, Colon und Gallenwege bei ambulant erworbenen intraabdominellen Infektionen (IAIs) dar [31]. Bei nosokomial erworbenen IAIs stellen Kolon- und Dünndarmläsionen die häufigsten Ursachen dar [31].

Spezifisch für die abdominelle Sepsis mit Kontamination der Bauchhöhle durch Bakterien ist, dass ein rascher Übertritt der Mikroorganismen in die Blutbahn stattfindet [16]. Dies liegt darin begründet, dass die Peritonealflüssigkeit bei Relaxation des Zwerchfells über diaphragmale Spalten in das subpleurale Lymphsystem drainiert wird und so in das venöse System gelangt [32]. Diese Mechanismen sind ursächlich für eine rasche systemische Reaktion bei IAI [16].

1.2.1 Einteilung

In einer Übersichtsarbeit zur Antibiotikatherapie intraabdomineller Infektionen stellt Eckmann die übliche Einteilung der Peritonitis in drei Formen anhand von pathogenetischen Unterschieden wie folgt dar [33]:

- Primäre Peritonitis: Infektion der Bauchhöhle ohne Organperforation z. B. im Rahmen einer spontan bakteriellen Peritonitis bei Aszites oder einer Peritonealdialyse
- Sekundäre Peritonitis: Austritt von Keimen durch Organperforation. Weitere Unterteilung in ambulant und nosokomial erworben, z. B. im Rahmen einer perforierten Appendizitis oder einer Anastomoseninsuffizienz
- Tertiäre Peritonitis: Rekurrende oder persistierende Infektion der Bauchhöhle nach stattgehabter und sanierter Hohlorganperforation

Entsprechend der pathophysiologischen Mechanismen werden primäre und tertiäre Peritonitis in der Regel konservativ behandelt [33]. Die sekundäre Peritonitis macht eine chirurgische Therapie erforderlich [33].

1.2.2 Erregerspektrum

Die Pathogene, die bei einer IAI Bedeutung haben, sind Teil der gastrointestinalen Flora und stellen ein breites Spektrum von aeroben und anaeroben sowie grampositiven und -negativen Bakterien als auch Pilzen dar [34]. Die Zusammensetzung der mikrobiologischen Besiedlung variiert unter anderem je nach Ursprung der IAI (oberer / unterer Gastrointestinaltrakt, biliäres System) als auch der Tatsache, ob diese nosokomial oder ambulant erworben wurde [35]. Insgesamt stellen Enterobacteriaceae die am häufigsten vorgefundenen Pathogene dar [36]. Weitere häufig vorkommende Keime sind Entero- und Streptokokken, Bacteroides, Anaerobes, aber auch *Candida albicans* [36]. Multiresistente Keime, von denen die meisten ESBL-Bildner sind, finden sich bei nosokomialen häufiger als bei ambulanten IAIs [34, 36].

1.2.3 Therapie

Die Fokussanierung nimmt im multimodalen Behandlungskonzept der Sepsis einen hohen Stellenwert ein. In der internationalen Leitlinie der Surviving Sepsis Campaign aus 2016 wird empfohlen, den Fokus so schnell wie möglich festzustellen und zu sanieren [37]. In einer prospektiven Observationsstudie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit septischem Schock als Folge einer Hohlorganperforation die Zeit bis zur chirurgischen Fokussanierung einen entscheidenden Faktor für die Überlebenschance darstellt [38]. Die Sterblichkeit bei Operationsbeginn später als sechs Stunden nach Krankenhausaufnahme betrug dabei 100 % [38].

Art und Umfang der Operation können je nach zugrunde liegender Ursache sehr stark variieren und reichen von der laparoskopischen Drainage bis zur Laparotomie mit Resektion und intraabdomineller Vacuum Assisted Closure (VAC)-Behandlung. Gemeinsames Therapiekonzept ist jedoch immer Entfernung des infektiösen Fokus bzw. die Wiederherstellung der Organintegrität, das Debridement zur Entfernung nekrotischen und infizierten Gewebes sowie die intraabdominelle Lavage [34, 39–41].

Eine postalische Umfrage unter britischen Chirurgen von 2005 ergab, dass 97 % der Teilnehmer eine intraoperative Peritoneallavage durchführten [42]. 61 % lavagierten bis zum Aufklaren der Lavageflüssigkeit [42]. Bei kontaminiertem Abdomen wie z. B. einer fäkalen Peritonitis war physiologische Kochsalzlösung (NaCl) mit 47 % die am häufigsten genutzte Lavagelösung, gefolgt von Povidon-Iod-Lösung mit 38 % [42].

Auch wenn die Fokuskontrolle bei sekundärer Peritonitis unumstrittenes Therapieziel ist und die intraabdominelle Peritoneallavage dabei regelmäßig durchgeführt wird, gibt es sowohl für die Durchführung der Lavage als auch zur verwendeten Lavagelösung wenig Evidenz [41–43].

In einer 1990 veröffentlichten randomisierten kontrollierten Studie von Schein et al. wurden Patienten mit einer IAI in drei Gruppen unterteilt. Nach entsprechender Versorgung des Fokus erfolgte entweder eine manuelle Säuberung der Peritonealhöhle mit Sauger und Bauchtüchern, eine Lavage mit NaCl oder eine Lavage mit NaCl und Chloramphenicol [44]. Ausschlusskriterien waren lokalisierte Abszesse, Durchführung einer Appendektomie über einen Wechselschnitt, diffuse fäkale Peritonitis, infizierte Pankreasnekrosen und postoperative Peritonitis [44]. Die Mortalität in den drei Gruppen lag bei 10–21 % und war nicht signifikant unterschiedlich [44].

Eine weitere randomisierte kontrollierte Studie verglich die Peritoneallavage mit physiologischer Kochsalzlösung plus Clindamycin-Gentamicin gegen Peritoneallavage ohne Antibiotikum nach laparoskopischer Sleeve-Gastrektomie [45]. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere peritoneale Kontamination mit Bakterien bei Verwendung von Clindamycin-Gentamicin Peritoneallavage [45].

Singal et al. untersuchten 2016 bei Patienten mit Peritonitis den Einfluss einer Peritoneallavage mit superoxidierte Lösung im Vergleich zu NaCl [46]. Dazu wurden die Patienten in zwei Gruppen randomisiert. Die erste erhielt nach Fokuskontrolle eine Peritoneallavage mit einem Liter NaCl, wonach 200 ml 1:1 verdünnter superoxidierte Lösung in die Bauchhöhle eingebracht wurde. Es wurden Drainagen eingelegt, die für eine Stunde abgeklemmt wurden, und es erfolgte der Bauchdeckenverschluss. Die Therapie der zweiten Gruppe erfolgte analog, bis auf den Unterschied, dass 200 ml Kochsalzlösung

instilliert wurde. In der ersten Gruppe, die mit superoxidierte Lösung behandelt wurde, zeigte sich eine geringere intraabdominale bakterielle Besiedlung sowie eine geringere Rate an Wundinfektionen. Ein signifikanter Unterschied in der Mortalität bestand nicht [46].

1.2.4 Tiermodelle

Zur Untersuchung der Pathophysiologie der Sepsis sowie zur Untersuchung neuer Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen stellt der Einsatz von Tiermodellen die beste, wenn nicht gar einzige Möglichkeit dar. Generell bieten sich kleine Nagetiere wie Mäuse als Versuchstiere an, da sie günstig zu beschaffen und zu halten sind, sich schnell vermehren und es diverse genetisch modifizierte Stämme gibt, anhand derer sich spezielle Fragestellungen untersuchen lassen [47].

Tiermodelle für die Sepsis lassen sich prinzipiell in drei Arten differenzieren [48]. Bei den beiden Arten von Injektionsmodellen werden entweder PAMP wie LPS oder spezifizierte Mengen bestimmter Bakterien meist intraperitoneal oder intravenös appliziert [48]. Die Vorteile bei diesen Verfahren sind eine hohe Reproduzierbarkeit und einfache Durchführung durch eine rasche, starke Aktivierung der angeborenen Immunabwehr [49]. Es wird jedoch in Kauf genommen, dass Komplexität und Folgen der Sepsis in diesen Modellen nur bedingt auftreten [49]. Die andere Art der Sepsismodelle baut auf einer gezielten Störung der intestinalen Barriere auf [48]. Bekannteste Modelle sind hier die Cecal Ligation and Puncture (CLP) und Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP), die beide eines fortgeschrittenen, chirurgisch-technischen Aufwands bedürfen [50, 51]. Weiterhin bedeuten gerade die chirurgischen Sepsismodelle ein erhöhtes Leiden und Schmerz für die Versuchstiere [52].

CASP

Die 1998 von Zantl et al. beschriebene CASP ist ein erfolgreiches Tiermodell in der Sepsisforschung [53]. Zur Sepsisinduktion wird ein Stent in das Colon ascendens von Mäusen eingebracht, wodurch eine permanente Dislokation von Pathogenen aus dem

Darm in die Bauchhöhle gegeben ist [50]. Dadurch entsteht regelhaft eine abdominelle Sepsis, die in ihrer Ausprägung und Symptomatik am ehesten mit dem Auftreten bei Menschen z. B. infolge einer Hohlorganperforation zu vergleichen ist [16]. Eine bakterielle Besiedlung von Blut, Peritoneallavage und Organen konnte zwölf Stunden nach Sepsisinduktion nachgewiesen werden [54]. Entsprechend waren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine erhöht [54]. Die Mortalitätsrate lässt sich bei der CASP durch den Stentdurchmesser variieren und liegt in verschiedenen Studien bei Einsatz eines 14 G Katheters bei 100 % [50, 53, 54]. Es ist jedoch bekannt, dass es jahreszeitliche Unterschiede in der Inflammation und dem Überleben nach CASP gibt [55].

Eine Modifikation dieses Modells stellt die Colon Ascendens Stent Peritonitis mit Intervention (CASPI) dar. Dabei erfolgt zunächst eine Sepsisinduktion durch CASP und nach einem Zeitintervall die Relaparotomie mit Stententfernung, Übernähung des Darmes und Peritoneallavage [53]. Bei Einsatz eines 14 G Stents resultiert eine Intervention drei Stunden nach Sepsisinduktion in einer Mortalität von 45 % [50]. Wird das Zeitintervall auf fünf bzw. neun Stunden verlängert, erhöht sich die Mortalität auf 90 % respektive 100 % [50].

CLP

Die CLP ist ein weiteres Tiermodell, das erfolgreich in der Sepsisforschung eingesetzt wird. Bei der Erstbeschreibung des Modells an Ratten wurde zur Induktion der intraabdominellen Sepsis das Zökum ligiert und mit einer Kanüle penetriert [56]. Im Laufe der Jahre setzte sich diese auch auf Mäuse übertragene Technik durch und wurde bereits als Goldstandard gehandelt [48, 57]. Es wird jedoch beschrieben, dass sich bei der CLP ein intraabdomineller Abszess und keine generalisierte Peritonitis ausbildet [48, 51, 54, 57]. Dies spiegelt sich in den deutlich geringeren Zytokinspiegeln nach CLP gegenüber der CASP wider [58]. Eine Variabilität der Mortalität ist bei der CLP kaum möglich [58].

1.3 Antiseptika

In dem Artikel „Zur Geschichte der Peritonitisbehandlung“ beschreibt Wolff, dass die Durchführung einer Peritoneallavage nach Fokuskontrolle durch Resektion, Übernähung oder anderen Verfahren bis zu den ersten erfolgreichen Ansätzen der Peritonitisbehandlung Anfang des 20. Jahrhunderts zurückgeht. Die Rationale war eine Elimination von Bakterien und Toxinen durch Herausspülen und Verdünnen. Neben dem Einsatz von physiologischer Kochsalzlösung wurden bereits früh andere Substanzen wie Äther, Zuckerköcherlösung, Pferdeserum etc. erprobt, ohne einen entscheidenden Vorteil aufzuweisen [59].

Dabei würde der Einsatz eines Antiseptikums als abdominale Lavagelösung potenziell einige Vorteile mit sich bringen, die in den Anforderungen an ein gutes Antiseptikum begründet liegen [60]. Zu diesen Anforderungen zählen [61, 62]:

- Gute Wirksamkeit gegenüber einem breiten Keimspektrum
- Keine Risiken für Bildung von Kreuz- / Resistenzen
- Erhaltene antiinfektive Potenz in Gegenwart organischer Substanzen
- Gute Gewebeverträglichkeit
- Geringe toxische Wirkung bei Resorption
- Kein oder seltenes Auftreten von allergischen Reaktionen

1.3.1 Povidon-Iod

Povidon (Polyvinylpyrrolidon, PVP)-Iod wirkt mikrobizid gegen Bakterien, Sporen, Pilze, Protozoen und Viren [63] und findet z. B. in der Wundantiseptik breite Anwendung [62]. Das mikrobizid wirkende Iod ist in wässriger Lösung größtenteils an PVP gebunden, welches eine hohe Affinität zu bakteriellen Zellmembranen besitzt [63]. Es folgt die Iodisation von membranständigen und zytoplasmatischen Zellbestandteilen, die zu einer Inaktivierung derselben und letztendlich zum Zelltod führen [63].

In einer Studie an Ratten aus 1979 kamen die Autoren zu dem Schluss, dass Povidon-Iod Lösung das Peritoneum schädigt [64]. Erfolgte eine Verdünnung auf für das Peritoneum unschädliche Konzentrationen, wurde keine Wirkung mehr gegen *E. coli* erzielt [64]. Lavigne et al. zeigten, dass eine i. p. Gabe von 2,5 ml/kg KG Povidon-Iod gegenüber NaCl eine Stunde nach Injektion von *E. coli* ins Peritoneum einen Überlebensvorteil für Ratten erzielte [65]. Bei Verlängerung des Intervalls bis zur Intervention auf zwei Stunden verstarben jedoch alle Tiere [65]. Povidon-Iod in einer Dosis von 8 ml/kg KG führte nach intraperitonealer Injektion zum Tod zuvor gesunder Versuchshunde [66]. Eine Dosis von 2 ml/kg KG beschrieben die Autoren als sicher für den Einsatz an gesunden Hunden [66]. Nach Induktion einer abdominalen Sepsis führte jedoch auch diese geringere Dosis zum Tod aller Versuchstiere, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass die intraperitoneale Anwendung von Povidon-Iod nicht zu empfehlen ist [66].

1.3.2 Octenidin

Aufgrund seiner Eigenschaft als Kation besitzt Octenidin eine starke Adhärenz zu negativ geladenen Komponenten bakterieller Zellmembranen wie z. B. Cardiolipin [67]. Dort reagiert es mit Polysacchariden und zytoplasmatischen Enzymen, wodurch es zu einer Zerstörung der Zellmembran mit folgender Zytolyse kommt [67]. Dementsprechend besteht ein breites antimikrobielles Spektrum gegen Bakterien, Mykoplasmen und Pilze [67]. Auch die Wirksamkeit gegenüber multiresistenten gramnegativen Keimen wurde nachgewiesen [68].

Eine Zulassung zur Verwendung im Peritoneum besteht jedoch nicht. Einerseits konnte bei In-vitro-Tests mit Octenidin keine Stimulation von TNF- α nachgewiesen werden und die intraabdominale Verwendung von 0,01%iger Lösung konnte die Entstehung von Adhäsionen bei Ratten verringern [69]. Andererseits wurde in case reports berichtet, dass die Verwendung von 0,1–0,025%iger Octeniseptlösung eine Peritonitis verursachen kann [69]. Ratten, die eine Peritoneallavage mit 0,05%iger Octenidinlösung erhielten, verstarben [69].

1.3.3 Taurolidin

Die breite Wirksamkeit von Taurolidin gegenüber Bakterien und Pilzen entsteht durch Abspaltung von drei aktiven Hydroxymethylgruppen [70], weshalb eine Einwirkungszeit von 6–24 Stunden benötigt wird [71]. Einerseits wird die Zellmembran von Bakterien durch die Reaktion mit den Hydroxymethylgruppen zerstört, andererseits erfolgt eine Vernetzung von LPS, wodurch dieses nicht freigesetzt wird und eine Aktivierung von PRRs unterbleibt [71].

Taurolidin wird unter dem Handelsnamen Taurolin® zur Anwendung bei Peritonitis sowie bei Weichteil- und Knochenverletzungen eingesetzt. Als TauroLock™ wird es zum Blocken von Kathetern genutzt. Kramer et al. wiesen eine gute Verträglichkeit von Taurolin® Ringer 0,5% gegenüber Peritoneum und Haut der neonatalen Ratte nach [71]. Es ist jedoch zu beachten, dass die bakterizide Wirkung erst nach 6–24 h eintritt [72]. Bei Verwendung von Taurolidin-haltigem Hydroxycellulosegel zur Behandlung sekundär heilender Wunden an Ratten verlängerte sich die Zeit bis zur kompletten Wundheilung durch eine langsamere Epithelialisierung gegenüber der Verwendung von reinem Hydroxycellulosegel bzw. keiner Wundbehandlung [73]. Die Anwendung als Peritoneallavage konnte bei Kindern mit Appendizitis die inflammatorische Aktivität nicht senken und wurde als nicht vorteilhaft beurteilt [74]. Entsprechend einer prospektiven randomisierten Doppelblindstudie, die den Effekt von Taurolidin auf das Outcome bei abdomineller Sepsis untersuchte, wurde in Bezug auf Klinik, Organversagen, Mortalität und bakteriologische Untersuchungen kein Vorteil gegenüber Placebo festgestellt [75].

1.3.4 Polihexanid

Polihexanid (PHMB) gehört wie Octenidin zu den kationischen Antiseptika. Es bindet u. a. an die sauren Phospholipide Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol (Cardiolipin) [76], die zu den häufigsten Glycerophospholipiden in bakteriellen Zellmembranen zählen, in Säugetierzellen jedoch kaum vorkommen [77]. Durch die Bindung wird einerseits das membranstabilisierende Ca^{2+} verdrängt, andererseits werden die gebundenen

Phospholipide durch die Polymerstruktur des PHMB vernetzt [78]. Diese Effekte führen zu einer erhöhten Permeabilität und letztendlich zum Verlust der Membranintegrität, was zum Untergang der Zelle führt [79]. Dadurch besitzt Polihexanid eine breite Wirksamkeit gegen Bakterien inklusive intrazellulären Pathogenen und Pilzen [79].

PHMB gilt als Antiseptikum der Wahl für kritisch kontaminierte und chronisch infizierte Wunden sowie Brandwunden [62]. In vitro zeigte sich gegenüber Betaisodona®-Lösung eine bessere Verträglichkeit bei der Spülung von Körperhöhlen als auch eine höhere antimikrobielle Aktivität bei stärkerer Blutbelastung [71]. Der Biokompatibilitätsindex setzt die antimikrobielle Aktivität in Relation mit der Zytotoxizität eines Antiseptikums in vitro [80]. Ein Biokompatibilitätsindex größer eins kennzeichnet ein effektives Antiseptikum mit relativ geringer Zytotoxizität [80]. Dies trifft für PHMB sowie Octenisept zu [80]. Ein Großteil der Meerschweinchen, die eine Peritoneallavage mit 0,05 % Lavasept® (0,0025 % Polihexanid) erhielten, verstarb auch ohne Induktion einer Peritonitis [81]. Nach Halbierung der PHMB-Konzentration bildeten die überlebenden Tiere weiterhin eine fibrinöse oder granulierende Peritonitis aus [81].

1.3.5 Polihexanid + Lipofundin®

Um die Zytotoxizität von PHMB weiter zu senken untersuchten Müller et al. basierend auf den o. g. Eigenschaften von Polihexanid die Kombination desselben mit Phosphatidylcholin enthaltenden Liposomen und Öl-in-Wasser Emulsionen [77]. Dabei konnte gezeigt werden, dass PHMB an Phosphatidylcholin bindet, welches in Lipofundin® MCT 20 % enthalten ist, wodurch die Konzentration freien Polihexanids bei erhaltener antimikrobieller Aktivität abnimmt [82].

Der antimikrobielle Effekt von PHMB 0,05 % in Lipofundin® MCT 20 % war im Vergleich zu PHMB 0,05 % in wässriger Lösung mindestens gleichwertig gegenüber *S. aureus* und *P. aeruginosa* [77]. Gleichzeitig wies Polihexanid in der Emulsion eine niedrigere Zytotoxizität gegenüber Mausfibroblasten auf als in der wässrigen Lösung [77]. Diese Ergebnisse qualifizieren die Kombination von PHMB und Lipofundin® als erfolgsversprechenden Kandidaten zur Anwendung als Peritoneallavage [77].

2 Fragestellung

Die Inzidenz der Sepsis nimmt in Deutschland als auch weltweit zu [4–6]. Insbesondere bei abdominellem Fokus besteht eine hohe Letalität [7, 26, 27]. Eines der wichtigsten Therapieziele ist die frühzeitige und sichere Fokussanierung [37]. Dabei führt ein Großteil der Chirurgen eine intraabdominelle Lavage mit Kochsalzlösung durch [42]. Eine Spülung mit Antiseptika könnte zu einer weiteren Therapieverbesserung führen. Die Verwendung von Octenidin, Taurolin und Povidon-Jod ist teilweise kontraindiziert oder zeigte in Studien keine Vorteile [66, 69, 75]. Polihexanid allein ist für die Anwendung in der Bauchhöhle nicht zugelassen. Im Meerschweinchenmodell führt es zu einer fibrinösen Entzündung und dem Versterben der meisten Tiere (Polihexanid 0,025 %) [81]. Es finden sich jedoch Hinweise, dass die Kombination aus Polihexanid und Lipofundin® eine reduzierte Toxizität und erhöhte antiseptische Aktivität aufweist, was es zu einem interessanten Kandidanten zur Anwendung als Peritoneallavage macht [77, 82].

In der folgenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob die Peritoneallavage mit einer Kombination aus Polihexanid (PHMB) und Lipofundin® im murinen Sepsismodell CASPI einen Vorteil gegenüber der Nutzung von physiologischer Kochsalzlösung bietet und welchen Einfluss die einzelnen Komponenten Polihexanid bzw. Lipofundin® haben. Primärer Outcome-Parameter ist die Überlebensrate der Tiere. Als sekundäre Outcome-Parameter wurden die bakterielle Besiedlung von Blut, Peritoneum, Leber, Niere, Milz und Lunge erfasst. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Zytokinspiegel, eine Blutbildanalyse sowie die Bestimmung des Serumkreatinins.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsgruppen

Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit wurden die Mäuse in vier Versuchsgruppen eingeteilt. Diese unterschieden sich in der Flüssigkeit, die für die Peritoneallavage genutzt wurde. Alle anderen Vorgänge erfolgten absolut identisch für jede Gruppe. Folgende Versuchsgruppen wurde gebildet:

- PHMB 0,05 % in Lipofundin® 10 %
- Lipofundin® 10 %
- PHMB 0,05 %
- NaCl 0,9 %

Teilversuch	Anzahl an Versuchstieren
Überlebenskinetik	24
Bakteriologie und Blutbild	4
Analyse der Zytokinspiegel	8
Klinische Chemie	8

Tabelle 1: Anzahl an Versuchstieren pro Teilversuch

3.2 Verwendetes Material

OPERATIONSBESTECK	
Pinzette, Nadelhalter, Schere, Mikronadelhalter, Mikroschere	Aesculap, Tuttlingen
LABORGERÄTE	
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Digitalwaage BL 150 S	Sartorius, Göttingen
FACScan™	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Precellys® 24	Peqlab, Erlangen
Reagenzglasschüttler Vortex	Merck Eurolab, Darmstadt
Spiralplattengerät mit Spiral® counting grid	Meintrup DWS, Löhden-Holte
Ultraschallbad Sonorex TK 52	Bandelin, Berlin
VetScan® HM5	Abaxis, Griesheim
Wasserbad	Medingen, Dresden
VERBRAUCHSMATERIAL	
BD Discardit™ II 10 ml	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Falcon™ Röhrchen 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Microlance™ 3 (20G)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Plastipak™ 1 ml Sub-Q	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Plastipak™ 20 ml	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Vacutainer® LH PST™ II	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
BD Venflon™ 18 G	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Blutagar Columbia	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
End-to-End Kapillare 20 µl K2E	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalskalpell Cutfix Stainless #10	Aesculap, Tuttlingen
Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Injekt® 5 ml	B. Braun, Melsungen
Leukoplast®	BSN medical, Hamburg
Mariderm schwarz 7/0 USP	Catgut, Markneukirchen
Mikrohämatokritkapillaren	BRAND, Wertheim
OP-Handschuhe Gammex® PF	Ansell, Tamworth-Staffordshire, UK
Pipettenspitzen (autoklaviert)	Eppendorf, Hamburg
Polyester weiß 4/0 USP	Catgut, Markneukirchen

3 Material und Methoden

Probengefäß EDTA KE /1.3	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (autoklaviert) 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Wattestäbchen	Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg

REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Buprenodale [®] (Buprenorphin 0,3 mg/ml)	Selectavet, Weyarn-Holzolling
CHAPS	VWR, Darmstadt
Complete Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cosmocil PG (PHMB 20 % in Aqua dest.)	B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz
Dulbecco's PBS w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺ , steril	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ecoflac [®] (NaCl 0,9 %)	B.Braun, Melsungen
Ecotainer [®] (Aqua)	B.Braun, Melsungen
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt mit 1 % Ethylmethylketon	Merck, Darmstadt
Hypnorm [®] (0,135 mg/ml Fentanyl / 10 mg/ml Fluanison)	VetaPharma Limited, Leeds, UK
Lipofundin [®] MCT 20 %	B.Braun, Melsungen
Midazolam 5 mg/ml	B.Braun, Melsungen
PEFA-Bloc	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sevofluran	AbbVie, Wiesbaden
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PUFFER UND LÖSUNGEN

Lysepuffer	1 mM EDTA, 0,25 % w/v CHAPS, 0,5 % v/v Tween 20, 1 mM PEFA-Bloc, 1 mM PMSF, 1 Tablette Complete pro 25 ml PBS
------------	---

KITS

CBA Mouse Inflammation Kit	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Precellys Keramik-Kit	Peqlab, Erlangen

TIERHALTUNG

Makrolonkäfige	Ehret, Emmendingen
ssniff [®] M-Z extrudiert	ssniff Spezialdiäten, Soest
LIGNOCEL [®]	Altromin Spezialfutter, Lage

Tabelle 2: Verwendetes Material

3.3 Methodik in vivo

3.3.1 Tiermodell

Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden im Voraus gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern unter dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-034/10 genehmigt.

Versuchstiere und Tierhaltung

Zum Einsatz kamen ausschließlich weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld), die bei Versuchsdurchführung ein Alter von acht bis zwölf Wochen sowie ein Körpergewicht von 20–25 g aufwiesen. Eine Gewöhnungszeit von zwei Wochen an die neue Umgebung im Tierstall (BioTechnikum, Walther-Rathenau-Straße 49a) wurde eingehalten. Es bestand ein Tag-Nacht-Rhythmus von je zwölf Stunden.

Die Unterbringung fand unter Standardbedingungen, d. h. in Makrolonkäfigen auf Einstreu bei Wasser und Pressfutter ad libitum statt. Die Gruppengröße betrug fünf bis zehn Tiere pro Käfig.

Alle Versuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Anästhesie und Schmerztherapie

Die operativen Eingriffe wurden in tiefer Narkose durchgeführt. Vor jedem Versuch wurde die Narkoselösung (1 ml Hypnorm[®] + 1 ml Midazolam in 2 ml Aqua) frisch angesetzt. Von dieser Lösung wurden 10 µl/g KG i. p. mit den 1 ml Subkutanspritzen appliziert. Die Narkosetiefe wurde anhand des Zwischenzehenreflexes sowie Setzen eines Schmerzreizes am Schwanz überprüft. Um das Auskühlen der Tiere während und nach der Operation zu verhindern, wurden diese rücklings mit Leukoplast[®] auf einer Wärmematte fixiert und nach Beendigung des Eingriffs unter eine Wärmelampe gelegt.

Zur postoperativen Schmerztherapie wurden 0,1 mg/kg KG Buprenorphin alle 24 h s. c. appliziert.

Colon Ascendens Stent Peritonitis

Zur Vorbereitung wurde ein 18 G Venenverweilkatheter 2 mm oberhalb seines Anfangs mit einer Schere zirkulär eingekerbt. Die Tiere wurden wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben narkotisiert und gelagert. Das Abdomen wurde mit 70%iger Ethanollösung desinfiziert, anschließend die Haut oberhalb der Symphyse mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und 1 cm nach kranial inzidiert. Die Bauchmuskulatur wurde entlang der Linea alba in gleicher Weise durchtrennt. Mittels zweier Wattestäbchen, die durch physiologische Kochsalzlösung angefeuchtet waren, wurden Coecum, Colon ascendens sowie terminales Ileum aufgesucht und ein Teil des ascendierenden Colons aus der Bauchhöhle luxiert.

Sodann wurde die Darmwand 10 mm aboral der Ileocoecalklappe antimesenterial tangential mit 7/0 Mariderm durchstoßen und ein chirurgischer Knoten vorgelegt. Direkt aboral desselben wurde nun der Venenverweilkatheter in das Darmlumen eingeführt und so weit vorgeschoben, bis die Kerbe auf Höhe der Serosa lag. Die Fadenenden des vorgelegten Knotens wurden nun um den Katheter gelegt und so geknotet, dass diese genau in der Kerbe lagen. Damit wurde eine Dislokation aus dem Darmlumen während der Versuchsdauer verhindert. Mittels eines weiteren Stiches und Knotens folgte eine letzte Fixierung in Richtung aboral. Danach wurde das Stahlmandrin entfernt und der Katheter 1–2 mm oberhalb der Darmwand abgeschnitten. Zur Sicherstellung der korrekten intraluminalen Lage und eines initialen Austritts von Faeces wurde mittels der Wattestäbchen ein wenig Stuhl aus dem Colon in den Katheter gedrückt.

Danach wurde die ausgelagerte Darmschlinge zurück in ihre ursprüngliche intraabdominelle Lage gebracht und 500 µl physiologische Kochsalzlösung zur Flüssigkeitssubstitution i. p. verabreicht. Faszienverschluss und Hautnaht erfolgten fortlaufend mit 4/0 Polyester. Die Schmerztherapie wurde wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

Intervention

Sechs Stunden nach Induktion der Sepsis durch die CASP wurde die Intervention durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde für jede Versuchsgruppe ein 18 G Venenverweilkatheter mit dem zuvor entfernten Stahlmandrin 2 mm oberhalb seines Anfangs durchstoßen. Dieser wurde im Folgenden als atraumatischer Absaugkatheter verwandt. Alsdann wurden die Tiere wie bei Durchführung der CASP narkotisiert und fixiert. Die Nähte der Voroperation wurden aufgetrennt und die Laparotomie bis wenige Millimeter kaudal des Sternums erweitert. Als nächstes wurde das Colon ascendens mit dem Stent aufgesucht. Die Fixationsnähte wurden mit dem Einmalskalpell durchtrennt und samt Katheter entfernt. Der Darmwanddefekt wurde durch eine Darmnaht mit 7/0 Mariderm verschlossen und die Suffizienz derselben getestet, indem mit den angefeuchteten Wattestäbchen vorsichtig etwas Stuhl im Darm mobilisiert wurde. Anschließend wurde das Abdomen zweimal mit drei Millilitern der auf 38 °C vorgewärmten Versuchsflüssigkeit ausgiebig lavagiert. Nach jedem Durchgang wurde die Lavage mit dem vorher präparierten Katheter und einer 20 ml Spritze vorsichtig rechts und links parakolisch abgesaugt. Abschließend erfolgten der fortlaufende Bauchwand- und Hautverschluss mit 4/0 Polyester.

Monitoring

Nach Beendigung der CASP-Operation wurden die Tiere engmaschig überwacht und einer klinischen Untersuchung entsprechend des Belastungsscores aus Anhang 2 unterzogen. Dieser umfasst sieben Parameter. Für jeden wurden nach steigender Belastung 0–3 Punkte vergeben. Bei einem Wert von drei Punkten in zwei oder mehr Parametern wurden diese als vier Punkte gewertet. Dadurch wird der Schwere der Belastung des Tieres zusätzlich Rechnung getragen. Tiere, die eine Summe von wenigstens zwölf Punkten erreichten, wurden als nicht überlebensfähig klassifiziert und schmerzfrei getötet.

3.3.2 Überlebenskinetik

Zur Erstellung der Überlebenskinetik wurden die Mäuse wie oben beschrieben einer CASPI unterzogen und für insgesamt zehn Tage post operationem beobachtet. Nach Abschluss des Beobachtungszeitraums wurden die überlebenden Tiere schmerzfrei getötet. In den ersten 48 h nach Sepsisinduktion erfolgte die Überwachung wie unter 3.3.1 beschrieben dreistündlich, weitere acht Tage lang achtstündlich. Bereits verendete Tiere wurden am Beobachtungszeitpunkt als Event erfasst. Solche mit einem Belastungsscore von zwölf oder mehr Punkten wurden entsprechend getötet und ebenfalls als Event verzeichnet. Tiere, die nach der Intervention nicht aus der Narkose aufwachten, wurden nicht eingeschlossen.

3.3.3 Probengewinnung

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Sepsisinduktion mit Sevofluran narkotisiert. Für die Erstellung des Blutbildes sowie der Bakteriologie wurde nach dem Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe der Retroorbitalplexus mit einer EDTA-Kapillare punktiert und das Blut in einem EDTA-beschichteten Probengefäß aufgefangen. Die Proben, die später der Bakteriologie dienen sollten, wurden zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Das Blut für die Bestimmung der Zytokinspiegel wurde mit einer Mikrohämatokritkapillare in ein Reaktionsgefäß abgenommen, nach erfolgter Gerinnung unter Raumtemperatur zweimal für zehn Minuten bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein neues Gefäß pipettiert. Das Serum wurde in 55 µl Aliquots aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Analyse des Serumkreatinins wurden Vacutainer[®] verwandt, die anschließend bei 1 300 g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden.

Nach erfolgter Blutentnahme wurden die Tiere noch unter Narkose durch cervicale Dislokation schmerzfrei getötet. Zur Gewinnung der Organe wurde die Tiere in Rückenlage auf einer Styroporplatte fixiert und die Bauch- und Thoraxregion mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Haut über Abdomen und Thorax wurde inzidiert und 6 ml sterile

NaCl-Lösung durch die freigelegte Bauchmuskulatur i. p. über eine Flexüle verabreicht. Nach ausgiebiger Lavage wurden 1–2 ml der Flüssigkeit wieder aufgezogen und in ein steriles Reaktionsgefäß gefüllt. Für die Analyse der Zytokinspiegel wurden diese zwei mal zwanzig Minuten bei 16 000 g zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt wurde. Anschließend erfolgten Thorakotomie und Laparotomie mit Organentnahme. Für die Bakteriologie wurden die Organe gewogen und auf Eis in 1 ml sterilem PBS zwischengelagert. Die Organe, die zur Zytokinspiegelanalyse genutzt werden sollten, wurden gewogen und in Precellys[®]-Tubes mit 1 ml Lysepuffer verbracht.

Alle Proben, die für das CBA vorgesehen waren, wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.4 Methodik ex vivo

3.4.1 Bakteriologie

Die Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald zeitgleich zu den Probenentnahmen. Leber, Nieren, Milz und Lunge wurden homogenisiert. Von dem Homogenisat wurden ebenso wie von Blut und Peritoneallavage 100 μl auf Blutagarplatten ausgespatelt und alle Platten für 18 h bei 37°C bebrütet. Die Auszählung erfolgte mit dem Spiral[®] counting grid.

3.4.2 Analyse der Zytokinspiegel

Für die quantitative Analyse der Zytokinspiegel wurde das CBA Mouse Inflammation Kit von BD genutzt. Dieses enthält sogenannte Capture Beads, die anhand ihrer Fluoreszenzintensität im roten Kanal des Durchflusszytometers unterschieden werden können. Auf der Oberfläche sind spezifische Antikörper gegen $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 oder IL-6 gebunden. Die Beads werden mit den zu messenden Proben bzw. den vorgegebenen Standardkonzentrationen der Zytokine sowie PE-konjugierten Antikörpern inkubiert. Da-

durch können die jeweiligen Konzentrationen anhand der Intensität der PE-Fluoreszenz quantifiziert werden.

Vorbereitung der Proben

Serum und Peritoneallavage mussten vor ihrer Verwendung lediglich dem Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut werden.

Lunge, Leber, Milz und Niere wurden ebenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut und im Homogenisator zwei mal zwanzig Sekunden bei 6 500 rpm homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation von zwei mal zwanzig Minuten bei 16 000 g, wobei der Überstand jeweils in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt wurde.

Durchführung des Cytometric Bead Arrays

Die im Folgenden verwendeten Lösungen und Puffer waren alle im Kit enthalten und werden daher nicht noch einmal extra aufgeführt.

Zunächst wurden die lyophilisierten Zytokine mit 2 ml Assay Diluent rekonstituiert und fünfzehn Minuten inkubiert, bis sie sich vollständig gelöst hatten. Von diesem Top Standard ausgehend wurden acht 1:2 Verdünnungsschritte mit dem Assay Diluent bis zu einer Verdünnung von 1:256 vorgenommen. Damit lagen Konzentrationen von 5000 pg/ml bis 20 pg/ml vor. Als Negativkontrolle diente reiner Assay Diluent.

Im nächsten Schritt wurden die Capture Beads vorbereitet. Nach gründlicher Resuspendierung mit dem Vortex wurden jeweils 10 µl der verschiedenen Beads für jede Probe und jeden Standardwert zusammenpipettiert.

Sodann wurden 50 µl der zehn Standards bzw. der Proben in fertig beschriftete Rundbodenröhrchen verbracht und mit 50 µl der Capture Beads sowie 50 µl des PE Detection Reagents zwei Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jedem Röhrchen 1 ml Wash Buffer hinzugefügt und fünf Minuten lang bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit 300 µl Wash Buffer resuspendiert.

Zur Kalibrierung des Flowzytometers wurden drei Rundbodenröhrchen mit 50 µl Cytometer Setup Beads befüllt. Zu Röhrchen B wurden 50 µl FITC Positive Control Detector und zu Röhrchen C 50 µl PE Positive Control Detector hinzupipettiert. Diese wurden lichtgeschützt dreißig Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Wash Buffer auf 500 µl aufgefüllt. Anhand dieser Standards wurde nun das Flow Cytometer kalibriert.

Nach erfolgreicher Kalibrierung wurden zunächst die Standards in aufsteigender Konzentration gemessen, danach folgten die Proben. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit der FCAP Array™ Software v1.0.1 von BD durchgeführt.

3.4.3 Blutbild

Nach Gewinnung der Blutproben erfolgte die Analyse mit dem VetScan® HM5. Die Messung innerhalb des Geräts erfolgt auf Basis von elektrischem Widerstand und chemischer Differenzierung / Lyseverhalten. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile sowie Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten bestimmt und ausgewertet.

3.4.4 Klinische Chemie

Die Blutproben wurden nach Entnahme und Zentrifugation wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben zum Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald zur weiteren Bearbeitung gebracht. Dort wurde der Serumkreatininspiegel nach herkömmlichen Methoden bestimmt.

3.5 Verblindung und Randomisierung

Sämtliche Versuche wurden randomisiert und verblindet durchgeführt und ausgewertet. Die Mäuse wurden zufällig aus dem Käfig gewählt und einer der vier Gruppen (siehe Kapitel 3.1) zugeordnet. Die Behälter mit den Lavageflüssigkeiten wurden vor Beginn

des Versuchstages von einer nicht mit dem Experiment betrauten Person mit den Ziffern eins bis vier beschriftet. Die Zuordnung wurde von dieser Person notiert und bis zum Abschluss der Auswertung sicher verwahrt.

Aufgrund des eindeutigen Farbunterschieds konnte eine Verblindung in der Hinsicht, ob die Lavage Lipofundin[®] enthält, während der Durchführung der Operation nicht erreicht werden. Für den Durchführenden war jedoch nicht ersichtlich, ob es sich um eine PHMB-haltige oder -freie Lavage handelte.

Die entnommenen Proben wurden entsprechend der Kennzeichnung der Mäuse beschriftet. Somit waren eine Verblindung und sichere Zuordnung nach Abschluss der statistischen Auswertung auch für die Ex-vivo-Experimente sichergestellt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

Für die Überlebenskinetik wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt und die Überlebensrate am Ende des Beobachtungszeitraums entsprechend berechnet. Der Vergleich der Kurven erfolgte paarweise mit dem Logrank-Test.

Zur Auswertung der In-vitro-Versuche wurde zunächst eine deskriptive Statistik in Form von Mittelwert und Standardabweichung erstellt. Diese Werte wurden als Balkendiagramme dargestellt. Aufgrund des Studiendesigns mit mehreren Gruppen kleiner Stichprobenumfänge kann eine Normalverteilung der Werte nicht sichergestellt werden. Daher erfolgte die weitere statistische Auswertung mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests. Bei Vorliegen einer Signifikanz wurde ein Vergleich der Gruppen mit dem Dunns-multiple-comparisons-Test durchgeführt.

Das allgemeine Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und in den Graphen mit einem * markiert. Bei Erreichen eines Signifikanzniveaus $\alpha = 0,01$ erfolgte die Markierung mit **, bei $\alpha = 0,001$ mit ***.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebenskinetik

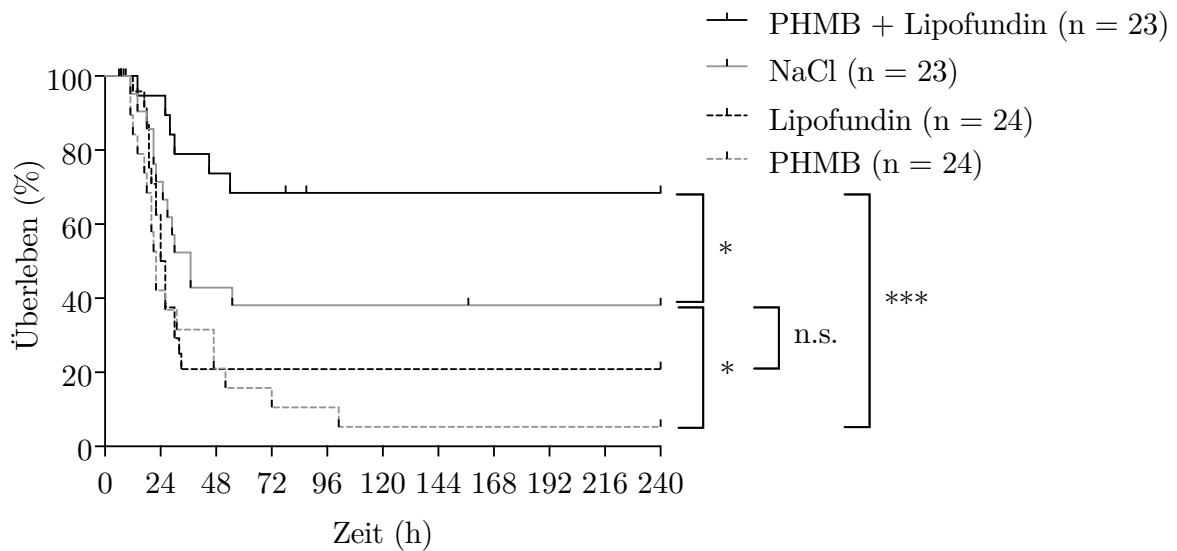


Abbildung 4.1: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenskinetik nach 18 G-CASP am Zeitpunkt 0 h und Intervention nach 6 h bei Verwendung der verschiedenen Flüssigkeiten zur Peritoneallavage

In Abbildung 4.1 stellt sich der Überlebensvorteil für die mit PHMB + Lipofundin® behandelten Tiere dar. Das Gesamtüberleben lag hier bei 68,4% und war signifikant höher als in allen Vergleichsgruppen. Die p-Werte sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Die mit NaCl lavagierte Kontrollgruppe wies ein Überleben von 38,1% auf. Dies war signifikant höher als in der PHMB-Gruppe. Zur Lipofundin-Gruppe (20,8% Überleben) bestand kein signifikanter Unterschied.

Die geringste Überlebensrate bestand in der PHMB-Gruppe mit 5,3%. Auffällig war hier das Versterben von Tieren zu sehr späten Zeitpunkten, zu denen in den anderen Gruppen keine Events mehr erfasst wurden.

	PHMB + Lipofundin [®]	NaCl	Lipofundin [®]	PHMB
PHMB + Lipofundin [®]		0,041	0,001	< 0,001
NaCl	0,041		0,144	0,020
Lipofundin [®]	0,001	0,144		0,322
PHMB	< 0,001	0,020	0,322	

Tabelle 3: Signifikanzwerte bei paarweisem Vergleich der Gruppen aus der Überlebenskinetik nach CASPI unter Verwendung der jeweiligen Lavageflüssigkeiten

4.2 Bakteriologie

In allen untersuchten Proben wies die Experimentalgruppe, die mit PHMB + Lipofundin[®] behandelt wurde, im Mittel die geringste Anzahl koloniebildender Einheiten (KbE) auf (vgl. Tabelle 4 und Abbildung 4.2). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen Experimentalgruppe und der NaCl gespülten Gruppe in Peritoneallavage ($6,4 \cdot 10^5 \pm 8,2 \cdot 10^5$ vs $7,4 \cdot 10^7 \pm 6,6 \cdot 10^7$ KbE), Leber ($4,9 \cdot 10^3 \pm 3,5 \cdot 10^3$ vs $7,9 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^7$ KbE) und Niere ($4,7 \cdot 10^3 \pm 5,3 \cdot 10^3$ vs $2,3 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$ KbE). Für den Vergleich der PHMB + Lipofundin[®]-Gruppe mit jener Kontrollgruppe, die nur mit Lipofundin[®] lavagiert wurde, ergaben sich eine signifikant niedrigere Anzahl an KbE in den Proben von Leber ($4,9 \cdot 10^3 \pm 3,5 \cdot 10^3$ vs $3,9 \cdot 10^6 \pm 3,9 \cdot 10^6$), Milz ($2,5 \cdot 10^3 \pm 3,8 \cdot 10^3$ vs $4,6 \cdot 10^6 \pm 6,5 \cdot 10^6$) und Lunge ($3,5 \cdot 10^3 \pm 5,2 \cdot 10^3$ vs $3,3 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$).

Die zweit niedrigste Keimlast in allen untersuchten Kompartimenten wies die Gruppe auf, die nur mit PHMB lavagiert wurde. Im Vergleich der Versuchsgruppen wurde kein Signifikanzniveau erreicht.

4 Ergebnisse

Die beiden Gruppen, die mit PHMB-freier Lavage behandelt wurden, wiesen die meisten KbE auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen NaCl- und Lipofundin®-Gruppe bestand in keinem der untersuchten Kompartimente.

	PHMB + Lipofundin®	NaCl	Lipofundin®	PHMB
Blut	$2,6 * 10^4 \pm 5,0 * 10^4$	$6,9 * 10^7 \pm 9,8 * 10^7$	$1,4 * 10^8 \pm 2,0 * 10^8$	$2,2 * 10^5 \pm 2,2 * 10^5$
Lavage	$6,4 * 10^5 \pm 8,2 * 10^5$	$7,4 * 10^7 \pm 6,6 * 10^7$	$2,5 * 10^7 \pm 5,7 * 10^6$	$4,7 * 10^6 \pm 3,0 * 10^6$
Leber	$4,9 * 10^3 \pm 3,5 * 10^3$	$7,9 * 10^6 \pm 1,2 * 10^7$	$3,9 * 10^6 \pm 3,9 * 10^6$	$8,4 * 10^4 \pm 1,2 * 10^5$
Niere	$4,7 * 10^3 \pm 5,3 * 10^3$	$2,3 * 10^6 \pm 2,4 * 10^6$	$5,7 * 10^5 \pm 7,3 * 10^5$	$3,1 * 10^4 \pm 3,3 * 10^4$
Milz	$2,5 * 10^3 \pm 3,8 * 10^3$	$1,6 * 10^6 \pm 2,6 * 10^6$	$4,6 * 10^6 \pm 6,5 * 10^6$	$4,8 * 10^4 \pm 4,8 * 10^4$
Lunge	$3,5 * 10^3 \pm 5,2 * 10^3$	$6,9 * 10^5 \pm 4,5 * 10^5$	$3,3 * 10^6 \pm 2,4 * 10^6$	$5,8 * 10^4 \pm 7,7 * 10^4$

Tabelle 4: Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl an KbE in den jeweiligen Kompartimenten 24 h nach Durchführung der CASP. Intervention und Lavage im Intervall von 6 h mit den angegebenen Flüssigkeiten. (n = 3–4)

4 Ergebnisse

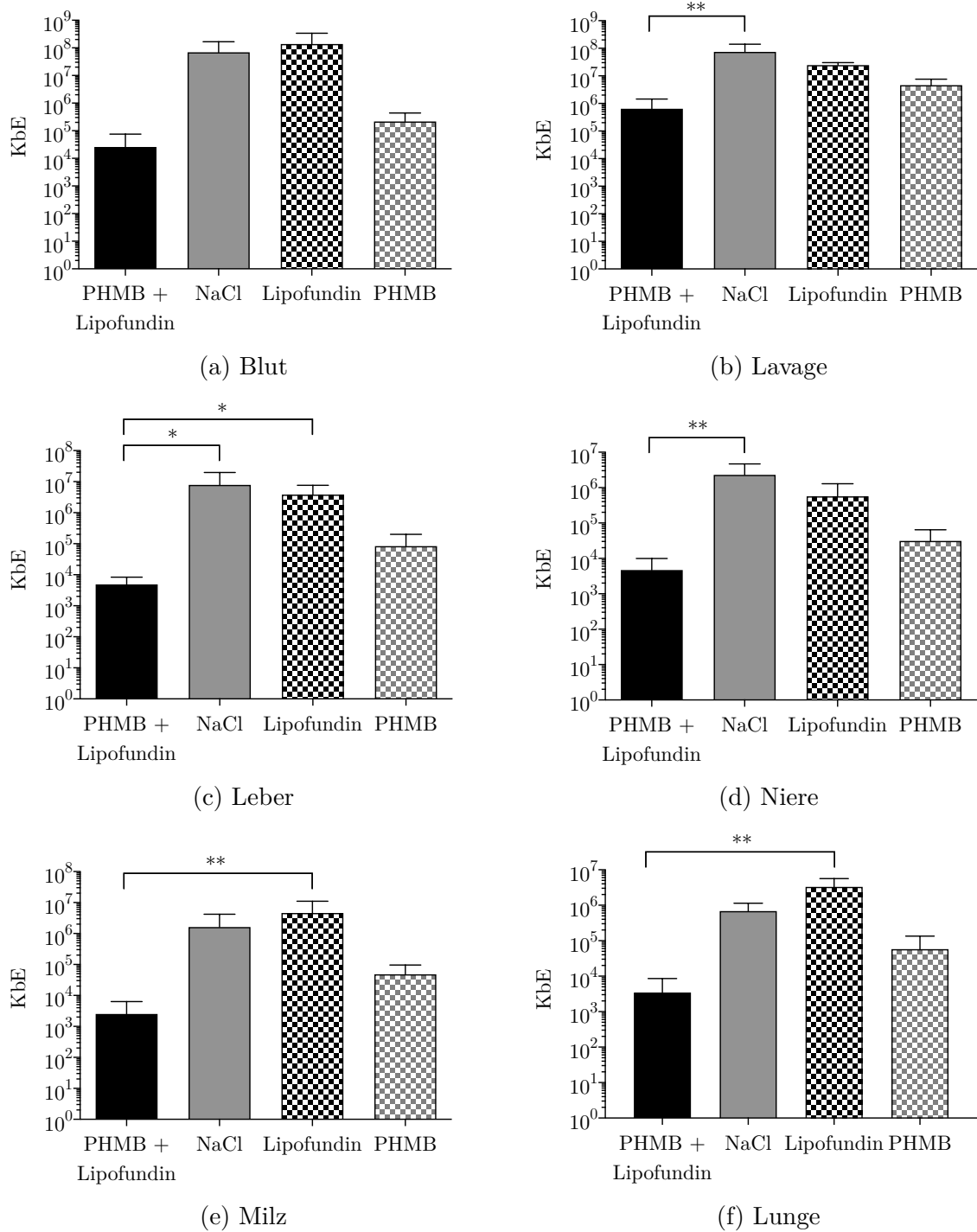


Abbildung 4.2: Anzahl der Kbe in Blut, Peritoneallavage und den verschiedenen Organen 24h nach Sepsisinduktion durch CASP. Intervention und Lavage im Intervall von 6 h mit den angegebenen Flüssigkeiten. (n = 3-4)

4.3 Zytokinspiegel

Die Serumspiegel von IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ waren 24 Stunden nach Sepsisinduktion durch CASP erhöht. Interindividuell gab es große Schwankungen und damit verbunden hohe Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ließen sich nicht nachweisen.

	Serum		Lunge		Leber		Milz	
IL-6								
PHMB + Lipofundin	6415,9	± 10198,6	431,4	± 246,3	815,5	± 850,2	22812,0	± 45288,7
NaCl	1602,2	± 3816,6	850,9	± 1564,4	245,5	± 106,9	1193,4	± 1465,1
Lipofundin	2645,9	± 4562,2	870,0	± 661,4	5606,0	± 11680,8	46121,0	± 110099,6
PHMB	6456,1	± 8730,4	4348,0	± 3896,5	1523,1	± 1339,3	13141,7	± 11649,7
IL-10								
PHMB + Lipofundin	271,7	± 370,1	82,3	± 30,5	769,6	± 225,0	149,9	± 60,2
NaCl	220,6	± 252,4	106,3	± 57,2	583,5	± 175,8	126,9	± 83,7
Lipofundin	72,8	± 78,5	118,8	± 44,9	703,5	± 255,0	151,8	± 195,8
PHMB	329,6	± 425,4	35,9	± 2,1	560,7	± 84,8	169,7	± 94,4
TNF-α								
PHMB + Lipofundin	722,3	± 918,2	209,3	± 247	236,0	± 109,3	1301,7	± 772,2
NaCl	67,6	± 56,9	83,6	± 56,7	159,1	± 48,9	382,5	± 135,3
Lipofundin	433,8	± 908,3	251,0	± 441,6	194,1	± 72,0	355,3	± 169,4
PHMB	632,2	± 605,5	137,3	± 61,9	194,9	± 58,6	1542,6	± 664,1
IFN-γ								
PHMB + Lipofundin	10,7	± 17,9	25,6	± 5,0	43,1	± 11,3	471,2	± 652,3
NaCl	3,3	± 1,0	24,9	± 12,7	37,5	± 11,0	139,5	± 45,2
Lipofundin	15,5	± 31,7	25,2	± 7,4	40,4	± 13,9	453,0	± 721,1
PHMB	5,8	± 1,2	24,2	± 8,0	37,9	± 3,1	179,1	± 53,1

Tabelle 5: Zytokinspiegel (in pg/ml bzw. pg/mg) in Blut, Lavage und Organen 24 h nach Durchführung der CASP. Peritoneallavage mit den angegebenen Flüssigkeiten im Intervall von 6 h (n = 3–8)

4.4 Blutbild

Die Leukozytenzahlen der Tiere, die mit Lipofundin[®]-haltiger Lavage behandelt wurden, waren niedriger als die der anderen Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 4.3). Dies korrelierte mit einer Abnahme der Lymphozyten- und Monozytenzahlen in den entsprechenden Gruppen. Die Tiere der Experimentalgruppe wiesen signifikant weniger Lymphozyten auf als die Tiere der PHMB-Gruppe ($0,63 \pm 0,37$ Gpt/l vs $1,85 \pm 0,58$ Gpt/l).

Die Neutrophilenzahlen in den Mäusen, die mit PHMB-haltiger Lavage behandelt wurden, waren erhöht gegenüber den anderen Gruppen. Ein Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

Die PHMB-Gruppe wies die höchsten Erythrozytenzahlen sowie den höchsten Hämatokrit auf. Es bestand ein signifikanter Unterschied gegenüber der NaCl-Gruppe mit den jeweils niedrigsten Werten für Erythrozyten ($10,8 \pm 0,9$ Tpt/l vs $8,4 \pm 0,9$ Tpt/l) und Hämatokrit ($44,2 \pm 3,6$ % vs $35,6 \pm 3,3$ %).

	PHMB + Lipofundin [®]	NaCl	Lipofundin [®]	PHMB
Leukozyten (Gpt/l)	$1,41 \pm 0,15$	$2,53 \pm 1,03$	$1,39 \pm 0,33$	$2,73 \pm 0,60$
Lymphozyten (Gpt/l)	$0,63 \pm 0,37$	$1,90 \pm 0,95$	$0,93 \pm 0,17$	$1,85 \pm 0,58$
Monozyten (Gpt/l)	$0,08 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,05$
Neutrophile (Gpt/l)	$0,69 \pm 0,42$	$0,46 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,17$	$0,77 \pm 0,07$
Erythrozyten (Tpt/l)	$9,30 \pm 0,38$	$8,37 \pm 0,87$	$9,18 \pm 0,69$	$10,8 \pm 0,85$
Hämatokrit (%)	$38,5 \pm 1,17$	$35,6 \pm 3,28$	$38,3 \pm 2,96$	$44,2 \pm 3,57$

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichung der untersuchten Blutzellen in den jeweiligen Versuchsgruppen 24 h nach Sepsisinduktion durch CASP. Lavage im Intervall von 6 h (n = 3–4)

4 Ergebnisse

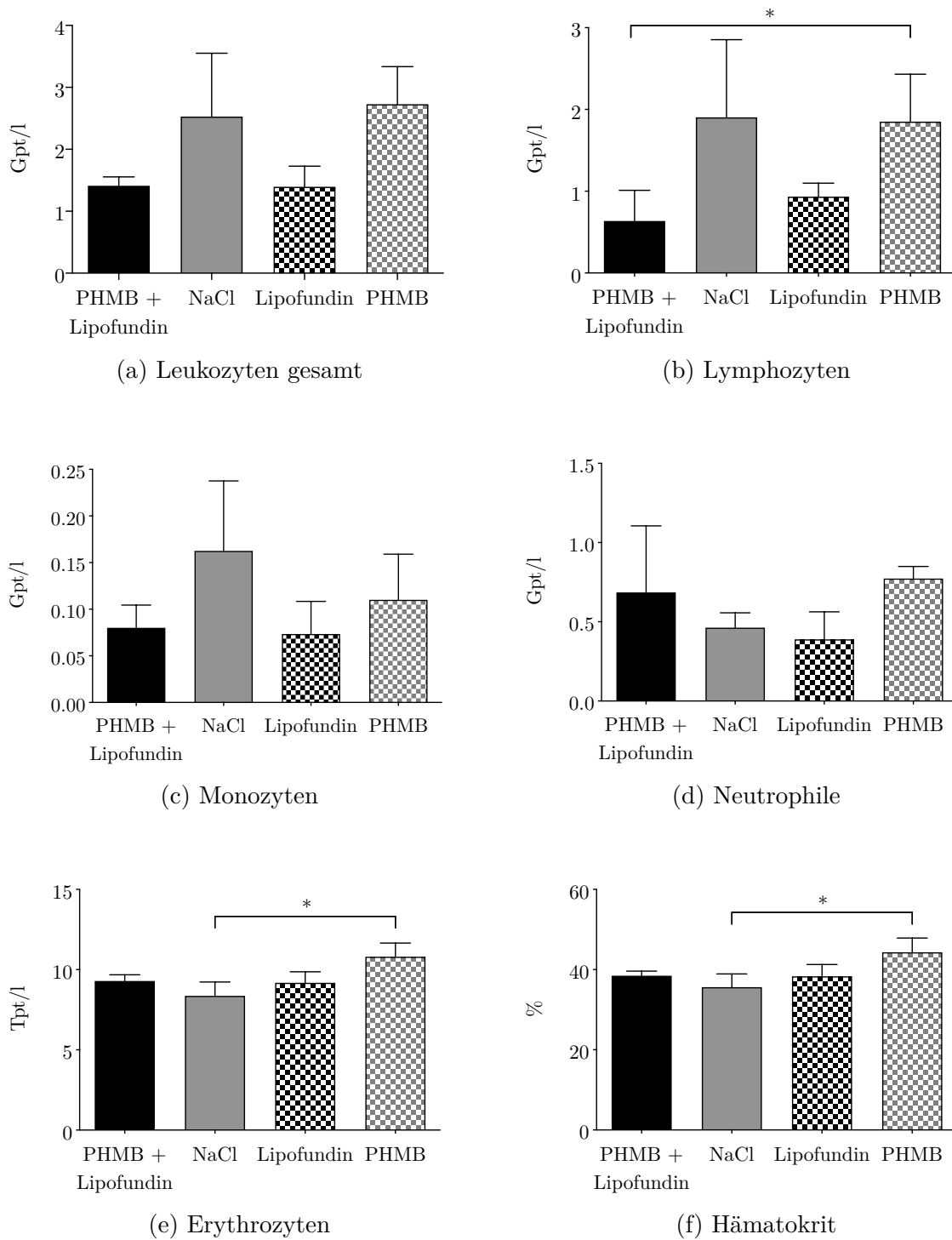


Abbildung 4.3: Blutbild 24 h nach Durchführung der CASP. Lavage mit den angegebenen Flüssigkeiten im Intervall von 6 h (n = 3–4)

4.5 Klinische Chemie

Versuchstiere, die mit PHMB alleine lavagiert wurden, wiesen 24 Stunden nach Sepsisinduktion ein signifikant erhöhtes Serumkreatinin gegenüber allen Gruppen auf. Zwischen den anderen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Serumkreatinins (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 4.4).

	Serumkreatinin ($\mu\text{mol/l}$)
PHMB + Lipofundin [®]	$15,4 \pm 6,6$
NaCl	$14,1 \pm 10,3$
Lipofundin [®]	$10,3 \pm 1,3$
PHMB	$59,4 \pm 28,7$

Tabelle 7: Mittelwert und Standardabweichung der Serumkreatininspiegel 24 h nach Sepsisinduktion durch CASP. Peritoneallavage mit den angegebenen Flüssigkeiten im Intervall von 6 h (n = 6–8)

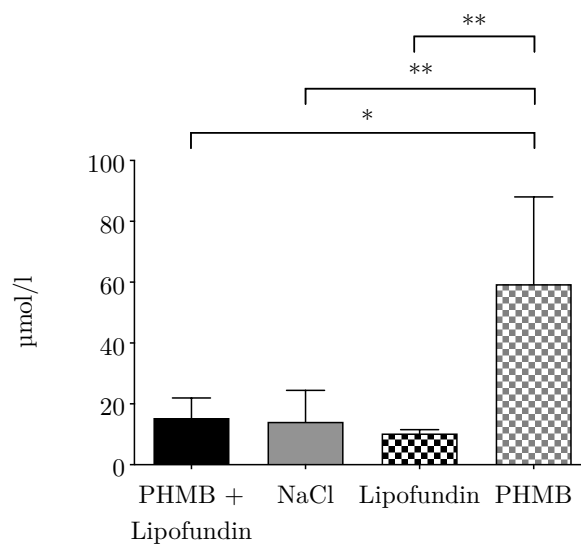


Abbildung 4.4: Serumkreatinin in den jeweiligen Gruppen 24 h nach Sepsisinduktion durch CASP. Peritoneallavage mit den angegebenen Flüssigkeiten im Intervall von 6 h (n = 6–8)

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Peritoneallavage mit PHMB + Lipofundin[®] auf die abdominale Sepsis zu untersuchen. Dazu wurde das Sepsismodell CASPI gewählt, da dieses eine diffuse Peritonitis auslöst. Die CLP hingegen führt zu einem intraabdominellen Abszess mit Sepsis, der ein anderes Krankheitsbild darstellt (vgl. Kapitel 1.2.4.) Es wurden Vergleichsgruppen gebildet, die mit physiologischer Kochsalzlösung oder den Einzelkomponenten PHMB bzw. Lipofundin[®] lavagiert wurden. Primärer Outcome-Parameter war die Überlebensrate nach Sepsisinduktion und Lavage mit den jeweiligen Lavageflüssigkeiten.

Wie unter 1.2.4 beschrieben liegt die Mortalität der CASPI bei 90–100 % bei einem Intervall von fünf bzw. neun Stunden zwischen CASP und Intervention, wenn ein 14 G Stent verwendet wird [50]. Um die Abläufe der Versuche möglichst optimal zu gestalten bot sich ein Intervall von sechs Stunden an. Dies kommt zudem der Situation an Patienten näher, bei denen sich eine IAI eher über Stunden und Tage entwickelt. Es erfolgte eine Reduktion des Stentdurchmessers auf 18 G, um die Mortalität bei Einsatz der Standardlavage NaCl zu senken und so auch den negativen Einfluss verschiedener Lavageflüssigkeiten in der Kaplan-Meier-Kurve besser untersuchen zu können.

Die Beobachtung der behandelten Tiere über zehn Tage zeigte, dass die Tiere, die mit der Kombination aus PHMB und Lipofundin[®] behandelt wurden, mit 68,4 % Überleben einen signifikanten Vorteil gegenüber allen anderen untersuchten Gruppen aufwiesen. Dies bestätigt die Hypothese dieser Arbeit, dass die o. g. Emulsion, die in vitro einen zytoprotektiven Effekt bei erhaltener antiseptischer Potenz aufwies [77], einen Überlebensvorteil im murinen Sepsismodell bietet.

Am Menschen wird in der Regel physiologische Kochsalzlösung zur Lavage angewandt. Eine Lavage mit NaCl-Lösung resultierte bei den durchgeführten Versuchen in einer Überlebensrate von 38,1 % und war signifikant schlechter als bei Einsatz von PHMB + Lipofundin®.

Tiere, die nur mit Polihexanid 0,05 % lavagiert wurden, wiesen die höchste Mortalitätsrate auf. In dieser Gruppe überlebten nur 5,3 % der Tiere und damit signifikant weniger als in der PHMB + Lipofundin®- sowie der NaCl-Gruppe. Auffällig war zudem, dass lediglich in der PHMB-Gruppe 72 h und später nach Sepsisinduktion Tiere verstarben. Diese Ergebnisse sind kongruent zu anderen tierexperimentellen Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass intraperitoneal angewandtes PHMB in einer Konzentration von 0,01 % oder höher toxisch wirkt und zum Versterben der Versuchstiere führt [81, 83].

Die zweite Komponente der untersuchten Emulsion – Lipofundin® – scheint allein keinen Effekt auf das Überleben der Versuchstiere zu haben. Die Überlebensrate lag mit 20,8 % zwar unter der Überlebensrate der NaCl-Gruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass das Antiseptikum Polihexanid, das bei intraperitonealer Anwendung toxisch wirkt, durch die Kombination mit Lipofundin® zu einer Emulsion wird, die im murinen Sepsismodell die Überlebensrate der behandelten Tiere signifikant verbessert.

Um die pathophysiologischen Vorgänge bei Verwendung einer PHMB + Lipofundin®-Peritoneallavage zu untersuchen, wurden verschiedene In-vitro-Versuche mit den unter 3.1 angegebenen Versuchsgruppen durchgeführt. Eine naheliegende Hypothese war, dass durch den Einsatz eines Antiseptikums die bakterielle Last in den Tieren reduziert wird. Daher wurde 24 h nach Sepsisinduktion durch CASP und entsprechender Intervention im Intervall eine Bakteriologie erstellt.

Es zeigte sich, dass bei Lavage mit der o. g. Emulsion sowohl im Blut als auch intraperitoneal und in den verschiedenen Organen die wenigsten KbE nachweisbar waren. Die Tiere, die mit PHMB allein lavagiert wurden, wiesen die zweit geringsten Bakterienzahlen auf. Müller et al. konnten 2013 nachweisen, dass der bakterizide Effekt von PHMB in

Lipofundin[®] gegen *Pseudomonas aeruginosa* stärker ist als der von PHMB in wässriger Lösung [82]. Die Beobachtung, dass unter PHMB + Lipofundin[®] eine geringere Keimlast als unter PHMB allein vorlag, könnte somit auch ein Effekt einer teilweise stärkeren antimikrobiellen Aktivität sein. Andererseits könnte dies auch mit der höheren Toxizität auf den Organismus in Zusammenhang stehen. Die vorliegende Arbeit kann diese Frage nicht beantworten.

Aus der Dissertation von Traeger ist bekannt, dass 6 h nach CASP sowohl am unmittelbaren Ort des septischen Geschehens, dem Peritoneum, als auch im Blut und den Organen Keime nachweisbar sind [58]. Im weiteren Zeitverlauf kommt es dann zur Zunahme der bakteriellen Last in allen Kompartimenten [58]. In dieser Arbeit wurde 6 h nach CASP die Intervention mit Verschluss der Kolonperforation und Revision des septischen Fokus mittels Lavage vorgenommen. Die Probenentnahme ist 24 h nach CASP vorgenommen worden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Last je nach verwendeter Lavage. Ob die Verwendung einer antiseptischen Lavage 6 h nach CASP das weitere Fortschreiten der bakteriellen Besiedlung verhindert oder dazu führt, dass sich die Anzahl an Bakterien rückläufig entwickelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Die Hypothese, dass sich durch die Keimelimination mittels PHMB + Lipofundin[®]-Lavage die Überlebenswahrscheinlichkeit der CASPI-Mäuse verbessert, wird durch die vorgelegten Ergebnisse gestützt. Tiere, die ebenfalls antiseptisch mit PHMB allein behandelt wurden, wiesen eine geringere bakterielle Last im Vergleich zu den nicht antiseptisch behandelten Tieren auf. Die Verwendung von PHMB allein führte jedoch zu einer deutlich schlechteren Überlebensrate als in allen anderen Versuchsgruppen. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass PHMB im Peritoneum toxisch wirkt [81, 83]. Die naheliegende Hypothese, dass die für PHMB + Lipofundin[®] in vitro nachgewiesene geringere Zytotoxizität bei erhaltener antiseptischer Wirkung zu einer besseren Verträglichkeit in vivo am Peritoneum führt, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Analyse der Zytokinpiegel in Serum, Lunge, Leber und Milz sollte klären, ob die Keimreduktion mittels antiseptischer Lavage einen Effekt auf die systemische Entzündung

im Körper der Versuchstiere hat und ob es einen Unterschied insbesondere zwischen der Lavage mit PHMB in Emulsion und in wässriger Lösung gibt. Insgesamt wurden in den verschiedenen Kompartimenten erhöhte Zytokinspiegel gefunden. Dabei bestand jedoch eine große Spannbreite der Werte innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Einen Unterschied der Zytokinspiegel zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnte nicht nachgewiesen werden. In der Literatur findet man bis dato keine Vergleichswerte für Zytokinspiegel nach Durchführung der CASPI. Durch die Intervention mit Lavage gibt es bei dieser Variante der CASP zwar mehr Einflussfaktoren auf das Outcome, diese spiegeln sich jedoch in den anderen Ergebnissen nicht wider.

Für die großen interindividuellen Abweichungen kommen verschiedene Ursachen in Frage. Osuchowski et al. untersuchten 2006 die Zytokinspiegel von CLP-Mäusen im Rahmen einer Überlebenskinetik. Sie konnten nachweisen, dass der IL-6 Spiegel von Tieren, die im frühen Sepsisverlauf verstarben, 6 h nach Sepsisinduktion signifikant höher war als in Tieren, die überlebten [84]. Des Weiteren konnten sie durch wiederholte Messungen an denselben Tieren zeigen, dass sich die Zytokinspiegel der Mäuse, die überlebten, weiter von den Tieren auseinander entwickelten, die im Verlauf starben [84]. Daher ist es auch denkbar, dass der interindividuelle Unterschied in den Gruppen den unterschiedlichen Zustand der Tiere zwischen präfinal und in Genesung befindlich widerspiegelt.

Um die Fragestellung zu klären, ob die verschiedenen Lavageflüssigkeiten einen Einfluss auf die Zytokinspiegel nehmen, sollte daher eine repetitive Bestimmung zu verschiedenen Zeitpunkten in Erwägung gezogen werden.

Eine Standarduntersuchung in der Klinik ist die Erstellung eines Blutbilds. Als Zeichen einer schweren Entzündung kann dabei sowohl eine Leukozytose als auch eine Leukozytopenie beobachtet werden.

Bei den untersuchten Tieren war eine geringere Leukozytenzahl in den Gruppen auffällig, die mit Lipofundin®-haltiger Peritoneallavage behandelt wurden. Dies korrelierte mit den Werten für Lympho- und Monozyten, wobei der Unterschied zwischen der Experimentalgruppe und der PHMB-Gruppe signifikant war.

Die Wirkung verschiedener Fettsäuren auf das Immunsystem ist aktueller Gegenstand der Forschung. Es wurde u. a. beschrieben, dass MCTs über NF- κ B aktivierend auf Zellen der Immunabwehr wirken [85, 86]. Cury-Boaventura et al. zeigten, dass die Infusion von MCT/ ω -6 LCT am Menschen zum Zelltod von Lymphozyten und Neutrophilen führte [87]. Da das in dieser Arbeit verwendete Lipofundin[®] ebenjene MCTs enthält, könnte der beobachtete Effekt auf die Leukozyten möglicherweise Resultat eines immunmodulatorischen Effekts sein.

Die immunmodulatorischen Eigenschaften der intraperitoneal eingesetzten MCTs in Kombination mit PHMB bieten viele offene Fragestellungen. In der Literatur findet man Hinweise, dass die Zusammensetzung der Lipide einen Einfluss auf immunologisch aktive Zellen und Prozesse hat [88]. Somit wäre es insbesondere interessant, ob der zytoprotektive Effekt, der für die Kombination Lipofundin[®] + PHMB nachgewiesen wurde, auch für die Kombination mit anderen Lipiden besteht und die immunmodulatorischen Eigenschaften sinnvoll eingesetzt werden können.

Um zu untersuchen, ob die Wahl der Lavageflüssigkeit einen Einfluss auf die Nierenfunktion im Rahmen der Sepsis hat, wurden Blutproben mit klassischen laborchemischen Methoden untersucht. Es zeigte sich, dass nach Lavage mit PHMB allein der Kreatininspiegel signifikant erhöht gegenüber den anderen Gruppen war.

Maier et al. fanden 18 Stunden nach 14 G CASP signifikant erhöhte Kreatininspiegel, die mit einer Anurie einhergingen. Somit konnte gezeigt werden, dass die CASP zu einem septisch bedingten Nierenversagen führt [89]. Die Tiere der PHMB-Gruppe wiesen ähnlich hohe Kreatininwerte auf, wie Maier et al. sie nach CASP beobachtet haben. Die Kreatininspiegel in den anderen Versuchsgruppen waren vergleichbar mit denen der durch Maier et al. nicht- oder Sham-operierten Tiere. Bei diesen war keine Penetration der Darmwand und somit keine Sepsisinduktion erfolgt. Daher ist davon auszugehen, dass bei den Tieren der PHMB-Gruppe ein akutes Nierenversagen vorlag.

In der Literatur finden sich nur wenige Informationen zur Nephrotoxizität von PHMB. Ratten, die regelmäßig 2–32 mg/kg KG PHMB oral verabreicht bekamen, wiesen histopathologisch leichte tubuläre Schädigungen auf, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied

der Kreatininspiegel zeigte [90]. Ein Review über die Effektivität, Sicherheit und den klinischen Einsatz von Polihexanid aus 2010 beschreibt eine insgesamt geringe Zyto- / Toxizität [79]. Untersuchungen zur Nephrotoxizität von PHMB bei intraperitonealem Einsatz liegen bis dato nicht vor.

Da der Kreatininspiegel in der PHMB-Gruppe signifikant höher als in allen Vergleichsgruppen war, ist es naheliegend, dass ein toxischer Effekt durch PHMB vorliegt. Die Versuchstiere befanden sich zwar in einer stark septischen Situation, die zu einer Niereninsuffizienz führt [18, 89], was jedoch auch für die Tiere der anderen Versuchsgruppen galt, die keinen erhöhten Kreatininspiegel aufwiesen. Für eine abschließende Bewertung, ob die intraperitoneale Anwendung von PHMB nephrotoxisch ist, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Da ein Mausmodell der intraabdominellen Sepsis genutzt wurde, unterliegt diese Studie grundsätzlichen Einschränkungen in Bezug auf die Vergleichbarkeit zur Sepsis beim Menschen sowie auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich der untersuchten Lavageflüssigkeit, die aktuell keine Zulassung zur Anwendung am Menschen hat. Einen wesentlichen Unterschied stellen die unterschiedlichen Spezies Mensch – Maus dar. Mäuse besitzen ein kleineres Genom als der Mensch und es bestehen deutliche Unterschiede in der immunologischen Funktion [47]. Aktiviertes Protein C ist beispielsweise ein Präparat, das sich im Tiermodell der Sepsis bewährt hat. In einer randomisierten doppelblinden placebokontrollierten Multicenterstudie an Patienten im septischen Schock wurde jedoch festgestellt, dass dieses Präparat beim Menschen keinen Einfluss auf die Mortalität hat [27]. In dieser Arbeit kamen als Versuchstiere ausschließlich junge, gesunde, weibliche Tiere zum Einsatz. Beim Menschen tritt die Sepsis jedoch unabhängig vom Geschlecht und häufig bei älteren Patienten auf, die multiple Vorerkrankungen haben [91]. Dies ist insofern wichtig, da die Mortalität der Sepsis bei Patienten mit Komorbiditäten höher ist als bei Patienten ohne Komorbiditäten [91]. Des Weiteren wird bei den eingesetzten Versuchstieren keine intensivmedizinische Behandlung z. B. mit parenteraler Flüssigkeits- und Antibiotikagabe, Katecholamintherapie etc. durchgeführt [92]. Das Geschlecht der Tiere spielt insofern eine Rolle, als dass Studien darauf hinweisen, dass hormonelle

Unterschiede zu einem besseren Outcome von weiblichen Individuen führt [93]. Auch die Zeitspanne, in der sich die Sepsis entwickelt, unterscheidet sich. Beim Menschen entwickelt sich diese in der Regel über mehrere Stunden bis Tage und das resultierende Multiorganversagen wird durch entsprechende supportive Maßnahmen herausgezögert oder verhindert [57, 93]. Im Gegensatz dazu wird die Sepsis im Mausmodell durch die Induktion rasch hervorgerufen und bis zur operativen Intervention nicht behandelt [57, 93].

Mit dieser Arbeit konnte die Hypothese belegt werden, dass die Peritoneallavage mit PHMB + Lipofundin[®] das Überleben der abdominalen Sepsis am Mausmodell verbessert. Dies geht mit einer geringeren bakteriellen Besiedlung der verschiedenen Kompartimente in den Versuchstieren einher. Auch in der Gruppe, die mit PHMB in wässriger Lösung behandelt wurde, war eine geringere Keimzahl als in den nicht antiseptisch behandelten Gruppen zu beobachten. Diese Gruppe wies jedoch die schlechteste Überlebensrate aller Versuchsgruppen auf. Es ist naheliegend, dass der diametrale Unterschied zwischen beiden Gruppen mit der *in vitro* nachgewiesenen geringeren Zytotoxizität von PHMB in Emulsion zusammenhängt. Die Mechanismen *in vivo*, die zu diesem Ergebnis führen, können durch diese Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

6 Zusammenfassung

Bei der Fokussanierung einer abdominalen Sepsis kommt meist eine Peritoneallavage mit physiologischer Kochsalzlösung zum Einsatz. Antibiotikahaltige Lösungen scheinen keinen Vorteil zu haben und der Zusatz von Antiseptika wie z. B. PHMB hat teils toxische Wirkungen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Kombination aus PHMB und Lipofundin® gegenüber PHMB in wässriger Lösung eine geringere Zytotoxizität bei erhaltener antiseptischer Aktivität in-vitro besitzt.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass eine Peritoneallavage mit dieser Emulsion einen Vorteil für das Überleben der abdominalen Sepsis bietet, wurde eine Überlebenskinetik am Sepsismodell CASPI durchgeführt. In weiteren Experimenten wurde die bakterielle Besiedlung 24 h nach Sepsisinduktion in Blut, Lavage und Organen ermittelt. Des Weiteren erfolgten die Bestimmung der Zytokinspiegel, die Erstellung eines Blutbildes sowie die laborchemische Bestimmung des Serumkreatinins.

Die höchste Überlebensrate mit signifikantem Unterschied zu allen Vergleichsgruppen zeigte sich in der PHMB + Lipofundin®-Gruppe mit 68,4 %, gefolgt von der mit NaCl lavagierten Gruppe mit 38,1 %. Die hohe Überlebensrate in der erstgenannten Gruppe korrelierte mit der niedrigsten bakteriellen Belastung in allen untersuchten Kompartimenten. PHMB in wässriger Lösung führte zu einer signifikant erhöhten Sterblichkeit mit einer Überlebensrate von nur 5,3 %. Im Gegensatz zu allen anderen Gruppen bestanden signifikant erhöhte Kreatininspiegel, die auf ein akutes Nierenversagen hindeuteten.

Die Kombination von PHMB und Lipofundin® könnte in Zukunft eine neue Therapieoption zur Behandlung der abdominalen Sepsis darstellen. Bis dato sind die Mechanismen in vivo, die den diametralen Unterschied im Überleben zwischen PHMB in Emulsion und in wässriger Lösung ausmachen, nicht geklärt. Auch In-vivo-Studien zur Toxizität stehen aus.

Literatur

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992;101:1644–55. DOI: 10.1378/CHEST.101.6.1644.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 2003;29:530–8. DOI: 10.1007/s00134-003-1662-x.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association* 2016;315:801–10. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
4. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M et al. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis: An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany From 2007 to 2013. *Deutsches Arzteblatt International* 2016;113:159–66. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159.
5. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG et al. Epidemiology of sepsis in Germany: Results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine* 2007;33:606–18. DOI: 10.1007/s00134-006-0517-7.
6. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS und Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical Care Medicine* 2012;40:754–61. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318232db65.
7. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Medicine* 2016;42:1980–9. DOI: 10.1007/s00134-016-4504-3.
8. Levy MM, Artigas A, Phillips GS et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* 2012;12:919–24. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70239-6.
9. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): Lessons from an International Sepsis Registry. *Infection* 2009;37:222–32. DOI: 10.1007/s15010-008-8203-z.
10. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B und EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Medicine* 2004;30:580–8. DOI: 10.1007/s00134-003-2121-4.

11. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J und Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 2001;29:1303–10. DOI: 10.1097/00003246-200107000-00002.
12. Chousterman BG, Swirski FK und Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. 2017. DOI: 10.1007/s00281-017-0639-8.
13. Takeuchi O und Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–20. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
14. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885–91. DOI: 10.1038/nature01326.
15. Poll T van der, Veerdonk FL van de, Scicluna BP und Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology* 2017;17:407–20. DOI: 10.1038/nri.2017.36.
16. Beyer K, Menges P, Keßler W und Heidecke CD. Pathophysiologie der Peritonitis. *Der Chirurg* 2016;87:5–12. DOI: 10.1007/s00104-015-0117-6.
17. Gotts JE und Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *The BMJ* 2016;353:i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585.
18. Poston JT und Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *The BMJ* 2019;364:k4891. DOI: 10.1136/bmj.k4891.
19. Levi M. The Coagulant Response in Sepsis. *Clinics in Chest Medicine* 2008;29:627–42. DOI: 10.1016/j.ccm.2008.06.006.
20. Rittirsch D, Flierl MA und Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:776–87. DOI: 10.1038/nri2402.
21. Walley KR. Sepsis-induced myocardial dysfunction. *Current Opinion in Critical Care* 2018;24:292–9. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000507.
22. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;122:2711–9. DOI: 10.1172/JCI62423..
23. Deutschman CS und Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* 2014;40:463–75. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.04.001.
24. Patricio P, Paiva JA und Borrego LM. Immune Response in Bacterial and Candida Sepsis. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2019;9:105–13. DOI: 10.1556/1886.2019.00011.
25. Hotchkiss RS, Monneret G und Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2013;13:862–74. DOI: 10.1038/nri3552.

26. Gordon AC, Perkins GD, Singer M et al. Levosimendan for the Prevention of Acute Organ Dysfunction in Sepsis. *The New England Journal of Medicine* 2016;375:1638–48. DOI: 10.1056/NEJMoa1609409.
27. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *New England Journal of Medicine* 2012;366:2055–64. DOI: 10.1056/NEJMoa1202290.
28. Vincent JL, Rello J, Marshall J et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Journal of the American Medical Association* 2009;302:2323–9. DOI: 10.1001/jama.2009.1754.
29. Gestel A van, Bakker J, Veraart CPWM und Hout BA van. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Critical Care* 2004;8:R153–R162. DOI: 10.1186/cc2858.
30. De Waele J, Lipman J, Sakr Y et al. Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:420. DOI: 10.1186/1471-2334-14-420.
31. Montravers P, Lepape A, Dubreuil L et al. Clinical and microbiological profiles of community-acquired and nosocomial intra-abdominal infections: results of the French prospective, observational EBIIA study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;63:785–94. DOI: 10.1093/jac/dkp005.
32. Abu-Hijleh MF, Habbal OA und Moqattash ST. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *Journal of Anatomy* 1995;186:453–67.
33. Eckmann C. Antibiotikatherapie intraabdomineller Infektionen im Zeitalter der Multiresistenz. *Der Chirurg* 2016;87:26–32. DOI: 10.1007/s00104-015-0106-9.
34. Montravers P, Blot S, Dimopoulos G et al. Therapeutic management of peritonitis: a comprehensive guide for intensivists. *Intensive Care Medicine* 2016;42:1234–47. DOI: 10.1007/s00134-016-4307-6.
35. Ruiter J de, Weel J, Manusama E, Kingma WP und Voort PHJ van der. The Epidemiology of Intra-Abdominal Flora in Critically Ill Patients with Secondary and Tertiary Abdominal Sepsis. *Infection* 2009;37:522–7. DOI: 10.1007/s15010-009-8249-6.
36. Sartelli M, Catena F, Ansaloni L et al. Complicated intra-abdominal infections in Europe: a comprehensive review of the CIAO study. *World Journal of Emergency Surgery* 2012;7:36. DOI: 10.1186/1749-7922-7-36.
37. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine* 2017;43:304–77. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.

38. Azuhata T, Kinoshita K, Kawano D et al. Time from admission to initiation of surgery for source control is a critical determinant of survival in patients with gastrointestinal perforation with associated septic shock. *Critical Care* 2014;18:R87. DOI: 10.1186/cc13854.
39. Sohn M, Iesalnieks I, Agha A et al. Perforated Diverticulitis with Generalized Peritonitis: Low Stoma Rate Using a “Damage Control Strategy”. *World Journal of Surgery* 2018;42:3189–95. DOI: 10.1007/s00268-018-4585-y.
40. Edmiston CE und Leaper DJ. Intra-Operative Surgical Irrigation of the Surgical Incision: What Does the Future Hold - Saline, Antibiotic Agents, or Antiseptic Agents? *Surgical Infections* 2016;17:656–64. DOI: 10.1089/sur.2016.158.
41. Ruler O van und Boermeester M. Die chirurgische Therapie der sekundären Peritonitis. *Der Chirurg* 2016;87:13–9. DOI: 10.1007/s00104-015-0115-8.
42. Whiteside OJH, Tytherleigh MG, Thrush S, Farouk R und Galland RB. Intra-operative peritoneal lavage - who does it and why? *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 2005;87:255–8. DOI: 10.1308/1478708051847.
43. Schein M. Surgical management of intra-abdominal infection: Is there any evidence? *Langenbeck’s Archives of Surgery* 2002;387:1–7. DOI: 10.1007/s00423-002-0276-z.
44. Schein M, Gecelter G, Freinkel W, Gerding H und Becker PJ. Peritoneal Lavage in Abdominal Sepsis: A Controlled Clinical Study. *Archives of Surgery* 1990;125:1132–5. DOI: 10.1001/archsurg.1990.01410210058008.
45. Ruiz-Tovar J, Llaveró C, Muñoz JL, Zubiaga L, Díez M und Obelche Group. Effect of Peritoneal Lavage with Clindamycin–Gentamicin Solution on Post-Operative Pain and Analytic Acute-Phase Reactants after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Surgical Infections* 2016;17:357–62. DOI: 10.1089/sur.2015.196.
46. Singal R, Dhar S, Zaman M, Singh B, Singh V und Sethi S. Comparative Evaluation of Intra-Operative Peritoneal Lavage with Super Oxidized Solution and Normal Saline in Peritonitis Cases; Randomized Controlled Trial. *Maedica* 2016;11:277–85.
47. Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM und Efron PA. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR Journal* 2017;58:90–105. DOI: 10.1093/ilar/ilx007.
48. Buras JA, Holzmann B und Sitkovsky M. Animal Models of Sepsis: Setting the Stage. *Nature reviews. Drug discovery* 2005;4:854–65. DOI: 10.1038/nrd1854.
49. Chen P, Stanojčić M und Jeschke MG. Differences Between Murine and Human Sepsis. *Surgical Clinics of North America* 2014;94:1135–49. DOI: 10.1016/j.suc.2014.08.001.

50. Traeger T, Koerner P, Kessler W et al. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized Model for Polymicrobial Abdominal Sepsis. *Journal of Visualized Experiments* 2010:e2299. DOI: 10.3791/2299.
51. Schabbauer G. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2012;9:e17–e21. DOI: 10.1016/j.ddmod.2011.10.002.
52. Lilley E, Armstrong R, Clark N et al. Refinement of Animal Models of Sepsis and Septic Shock. *Shock* 2015;43:304–16. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000318.
53. Zantl N, Uebe A, Neumann B et al. Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis. *Infection and Immunity* 1998;66:2300–9.
54. Maier S, Traeger T, Entleutner M et al. Cecal Ligation and Puncture Versus Colon ascendens Stent Peritonitis: Two Distinct Animal Models for Polymicrobial Sepsis. *Shock* 2004;21:505–11. DOI: DOI10.1097/01.shk.0000126906.52367.dd.
55. Kiank C, Koerner P, Kessler W et al. Seasonal variations in inflammatory responses to sepsis and stress in mice. *Critical Care Medicine* 2007;35:2352–8. DOI: 10.1097/01.ccm.0000282078.80187.7f.
56. Wichterman KA, Baue AE und Chaudry IH. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* 1980;29:189–201. DOI: 10.1016/0022-4804(80)90037-2.
57. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E und Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in Microbiology* 2011;19:198–208. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.001.
58. Traeger T. Cecal Ligation and Puncture (CLP) oder Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP). Eine komparative Studie zweier Tiermodelle für polymikrobielle Sepsis. Dissertation. Technische Universität München, 2003.
59. Wolff H. Zur Geschichte der Peritonitisbehandlung. *Zentralblatt für Chirurgie* 2002;127:62–7. DOI: 10.1055/s-2002-20232.
60. McAvinchey DJ, McCollum PT, McElearney NG, Munding G und Lynch G. Antiseptics in the treatment of bacterial peritonitis in rats. *British Journal of Surgery* 1983;70:158–60. DOI: 10.1002/bjs.1800700307.
61. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P und Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 9. Auflage. 2008:785.
62. Kramer A, Dissemond J, Kim S et al. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. 2018. DOI: 10.1159/000481545.
63. Zamora JL. Chemical and Microbiologic Characteristics and Toxicity of Povidone-Iodine Solutions. *The American Journal of Surgery* 1986;151:400–6. DOI: 10.1016/0002-9610(86)90477-0.

64. Ahrenholz DH und Simmons RL. Povidone-Iodine in Peritonitis: I. Adverse Effects of Local Instillation in Experimental *E. coli* Peritonitis. *The Journal of Surgical Research* 1979;26:458–63. DOI: 10.1016/0022-4804(79)90034-9.
65. Lavigne JE, Brown CS, Machiedo GW, Blackwood JM und Rush BFJ. The Treatment of Experimental Peritonitis with Intraperitoneal Betadine Solution. *Journal of Surgical Research* 1974;16:307–11. DOI: 10.1016/0022-4804(74)90047-X.
66. Lagarde MC, Bolton JS und Cohn I. Intraperitoneal Povidone-Iodine in Experimental Peritonitis. *Annals of Surgery* 1978;187:613–9. DOI: 10.1097/00000658-197806000-00005.
67. Assadian O. Octenidine dihydrochloride: Chemical characteristics and antimicrobial properties. *Journal of Wound Care* 2016;25:S3–6. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.sup3.s3.
68. Alvarez-Marin R, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Kieffer N und Poirel L. Antimicrobial activity of octenidine against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017;36:2379–83. DOI: 10.1007/s10096-017-3070-0.
69. Hübner NO, Siebert J und Kramer A. Octenidine Dihydrochloride, a Modern Antiseptic for Skin, Mucous Membranes and Wounds. *Skin Pharmacology and Physiology* 2010;23:244–58. DOI: 10.1159/000314699.
70. Traub WH, Leonhard B und Bauer D. Taurolidine: in vitro Activity against Multiple-Antibiotic-Resistant, Nosocomially Significant Clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, and Diverse Enterobacteriaceae. *Chemotherapy* 1993;39:322–30. DOI: 10.1159/000239144.
71. Kramer A, Adrian V, Rudolph P, Wurster S und Lippert H. Explantationstest mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte als Voraussagetest zur Verträglichkeit lokaler Antiinfektiva für Wunden und Körperhöhlen. *Der Chirurg* 1998;69:840–5.
72. Skripitz R und Werner H. Bakterizide Langzeit-Wirkung ausgewählter Antiseptika. *Hygiene & Medizin* 1994;17:199–204.
73. Simpson JM, Séguin B und Gitelman AI. Effects of topical application of taurolidine on second intention healing of experimentally induced wounds in rats. *American Journal of Veterinary Research* 2008;69:1210–6. DOI: 10.2460/ajvr.69.9.1210.
74. Schneider A, Sack U, Rothe K und Bennek J. Peritoneal taurolidine lavage in children with localised peritonitis due to appendicitis. *Pediatric Surgery International* 2005;21:445–8. DOI: 10.1007/s00383-005-1428-3.
75. Willatts SM, Radford S und Leitermann M. Effect of the antiendotoxic agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrome: A placebo-controlled, double-blind trial. *Critical Care Medicine* 1995;23:1033–9. DOI: 10.1097/00003246-199506000-00007.

76. Broxton P, Woodcock PM, Heatley F und Gilbert P. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* 1984;57:115–24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb02363.x.
77. Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D und Koburger T. Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. *Chemico-Biological Interactions* 2011;190:171–8. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.02.024.
78. Gilbert P und Moore LE. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* 2005;99:703–15. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x.
79. Hübner NO und Kramer A. Review on the Efficacy, Safety and Clinical Applications of Polihexanide, a Modern Wound Antiseptic. *Skin Pharmacology and Physiology* 2010;23:17–27. DOI: 10.1159/000318264.
80. Müller G und Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61:1281–7. DOI: 10.1093/jac/dkn125.
81. Berg A, Assadian O, Rudolph P, Mundkowski RG, Janda J und Kramer A. Intolerability to Lavasept® peritoneal lavage in experimentally induced peritonitis in the guinea pig. *Hygiene & Medizin* 2008;33:189–93.
82. Müller G, Koburger T und Kramer A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. *Chemico-biological interactions* 2013;201:58–64. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.01.001.
83. Lauenstein P. Untersuchung zur Peritonealverträglichkeit von Polihexanid im Meerschweinchenmodell. Dissertation. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2007.
84. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J und Remick DG. Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *The Journal of Immunology* 2006;177:1967–74. DOI: 10.4049/jimmunol.177.3.1967.
85. Olthof ED, Gülich AF, Renne MF et al. Immune activation by medium-chain triglyceride-containing lipid emulsions is not modulated by n-3 lipids or toll-like receptor 4. *Toxicology in Vitro* 2015;29:1851–8. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.07.004.
86. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH und Hwang D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:16683–9. DOI: 10.1074/jbc.M011695200.

87. Cury-Boaventura MF, Gorjão R, Martins de Lima T et al. Effect of medium/ ω -6 long chain triglyceride-based emulsion on leucocyte death and inflammatory gene expression. *Clinical & Experimental Immunology* 2011;165:383–92. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04432.x.
88. Wanten GJ und Calder PC. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007;85:1171–84. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1171.
89. Maier S, Emmanuilidis K, Entleutner M et al. Massive Chemokine Transcription in Acute Renal Failure Due to Polymicrobial Sepsis. *Shock* 2000;14:187–92. DOI: 10.1097/00024382-200014020-00019.
90. Asiedu-Gyekye IJ, Mahmood AS, Awortwe C und Nyarko AK. Toxicological assessment of polyhexamethylene biguanide for water treatment. *Interdisciplinary Toxicology* 2015;8:193–202. DOI: 10.1515/intox-2015-0029.
91. Stoller J, Halpin L, Weis M et al. Epidemiology of Severe Sepsis: 2008-2012. *Journal of Critical Care* 2016;31:58–62. DOI: 10.1016/j.jcrc.2015.09.034.
92. Dyson A und Singer M. Animal models of sepsis: Why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Critical Care Medicine* 2009;37:S30–S37. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181922bd3.
93. Zanotti-Cavazzoni SL und Goldfarb RD. Animal Models of Sepsis. *Critical Care Clinics* 2009;25:703–19. DOI: 10.1016/j.ccc.2009.08.005.

Anhang

1 Kongressbeiträge / Veröffentlichungen

1. Diedrich S, Sandbrink C, Kramer A et al. An innovative antiseptic emulsion for peritoneal lavage increases survival of experimental peritonitis in mice. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2011;396:927. DOI: 10.1007/s00423-011-0830-7.
2. Diedrich S, Müller G, Sandbrink C et al. Efficiency of Emulsified Particle-Associated Polyhexamethylenbiguanid-Hydrochlorid (Polihexanide) for Peritoneal Lavage in a Murine Sepsis Model. *Surgical Infections* 2018;19:723–8. DOI: 10.1089/sur.2018.132.

2 Belastungsscore

Parameter	Untersuchung	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	Inspektion	- normal, sauber gepflegtes Fell	0
		- gesträubtes Fell	1
		- nasses Fell	2
		- schleimige Augen	3
Atmung	Inspektion	- normal	0
		- beschleunigt	1
		- schwer	2
		- schwach	3
Gewichtsverlust	Waage	< 5 %	0
		< 15 %	1
		< 20 %	2
		> 20 %	3
Spontanverhalten	Beobachtung	- normal, lebhaft, neugierig	0
		- verlangsamt, sitzende Haltung	1
		- träge, buckelige Haltung, schwankender Gang	2
		- Seitenlage	3
Provoziertes Verhalten	Beobachtung	- Maus flieht bei Käfigöffnung	0
		- flieht bei Annäherung der Hand	1
		- flieht erst bei Berührung	2
		- flieht gar nicht	3
Palpation des Abdomens	Palpation	- weich, kein Druckschmerz	0
		- weich, geringe Schmerzreaktion	1
		- Resistenz, deutliche Reaktion	2
		- hart, deutliche Schmerzreaktion	3
Kotbeschaffenheit	Inspektion	- viel Kot im Käfig, koten während Untersuchung	0
		- viel, blutiger, schleimiger Kot	1
		- wenig Kot im Käfig	2
		- kein frischer Kot im Käfig	3

Tabelle 8: Belastungsscore

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Dass ich diese Arbeit erstellen konnte, verdanke ich verschiedenen Menschen, von denen ich einige hier erwähnen möchte. Für die Aufnahme in die chirurgische Forschungsgruppe und die Möglichkeit im Labor zu arbeiten danke ich Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. habil. Wolfram Kessler für die Annahme meines Themas und die gute Betreuung. Er stand mir mit Sachverstand und Erfahrung zur Seite und wusste auch in schwierigen Situationen zu helfen.

Von der ersten Stunde an betreute mich Dr. med. Stefan Diedrich im Forschungslabor, führte mich in die Methodik ein und half mir bei Planung und Evaluation der Versuche. Bis zur Fertigstellung der Promotionsschrift stand er mir für Fragen und Korrekturen zur Verfügung. Vielen Dank dafür.

Im Labor wurde ich tatkräftig und mit hohem Sachverstand von Antje Janetzko und Doreen Biedenweg unterstützt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte. Ein weiterer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin, insbesondere Prof. Dr. med. Axel Kramer und Dr. rer. nat. Gerald Müller.

Die Firma B. Braun Medical AG unterstützte diese Studie dankenswerterweise finanziell. Eine inhaltliche Beteiligung an der Arbeit fand nicht statt.

Dass ich zu dem Menschen heranwuchs, der ich heute bin, verdanke ich meinen Eltern Winfried und Maria Sandbrink. Sie haben mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir so viel ermöglicht. Ich werde euch immer dankbar sein.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die bei all der Arbeit so viel Zeit auf mich verzichten muss: Iduna und unsere drei Kinder Jakob, Nela und Anna. Ihr macht mich zu einem sehr glücklichen Menschen.