

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin  
Geschäftsführender Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Helmut Bertalanffy  
Institut für Theoretische Chirurgie  
Kommissarischer Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

und der

Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Hinnerk Wulf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Perioperative Risikofaktoren für ein verschlechtertes  
Überleben bei postoperativer Sepsis:  
Bedeutung von Hypothermie und Unterernährung im  
Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

**Sebastian Ulrich Rühlmann**  
aus Duisburg

Marburg, 2006

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 9. März 2006**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs**

**Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Bernhard Maisch  
Referent: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Artur Bauhofer  
Korreferent: Univ. Prof. Dr. med. Martin Max**

*Für meine Eltern*

*Christiane und Ulrich Rühlmann*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	SEPSIS: BEDEUTUNG UND DEFINITION	1
1.2	AKTUELLER STAND DER SEPSISFORSCHUNG	4
1.3	DIE BEDEUTUNG VON G-CSF	9
1.4	RISIKOFAKTOREN FÜR EIN SCHLECHTES SEPSISOUTCOME	11
1.5	HYPOTHERMIE ALS RISIKOFAKTOR?	14
1.6	UNTERERNÄHRUNG ALS RISIKOFAKTOR?	22
1.7	CMRT (KLINIK MODELLIERENDE RANDOMISIERTE STUDIEN)	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
2.1	VERSUCHSTIERE	28
2.2	REAGENZIEN, MATERIALIEN	28
2.3	AUFARBEITUNG DER STUHLSPENSION	29
2.4	VERSUCHSABLAUF AM EINZELNEN TIER	30
2.4.1	<i>Versuchsdesign</i>	30
2.4.2	<i>Allgemeiner Versuchsaufbau und operative Durchführung</i>	35
2.4.3	<i>Zusätzliches Vorgehen bei den Versuchen zur Hypothermie</i>	37
2.4.4	<i>Zusätzliches Vorgehen bei den Versuchen zur Unterernährung</i>	38
2.5	ERSTELLUNG DES DIFFERENTIALBLUTBILDES, MESSUNG VON ZYTOKINEN UND PHAGOZYTOSEAKTIVITÄT DER GRANULOZYTEN UND MONOZYTEN	39
2.6	STATISTIK	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
3.1	STUHL-DOSIS-WIRKUNGSKURVE	41
3.2	VERSUCHSREIHE ZUR HYPOTHERMIE	43
3.2.1	<i>Versuch 1: Der Einfluss von präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate, Zytokinausschüttung und Differentialblutbild</i>	43
3.2.2	<i>Versuch 2: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate; niedrige Komplexität (keine Antibiotikaphylaxe)</i>	51
3.2.3	<i>Versuch 3: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlich appliziertem G-CSF auf die Überlebensrate, Differentialblutbild, Zytokinausschüttung und Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten; höhere Komplexität (mit Antibiotikaphylaxe)</i>	53
3.3	VERSUCHSREIHE ZUR UNTERERNÄHRUNG	61
3.3.1	<i>Versuch 1: Vorversuch zur Erprobung der Entwicklung chronischer Unterernährung</i>	61

3.3.2	<i>Versuch 2: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Alter der Tiere beider Gruppen bei ACI</i> .....	64
3.3.3	<i>Versuch 3: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Gewicht der Tiere beider Gruppen bei ACI</i> .....	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
4.1	CMRTs .....	72
4.2	STUHL-DOSIS-WIRKUNGSKURVE .....	74
4.3	VERSUCHSREIHE ZUR HYPOTHERMIE .....	75
4.3.1	<i>Der Einfluss von präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate, Zytokinausschüttung und Differentialblutbild</i> .....	76
4.3.2	<i>Der Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlich appliziertem G-CSF auf die Überlebensrate, Differentialblutbild, Zytokinausschüttung und Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten</i> .....	79
4.3.3	<i>Perioperative Hypothermie als Risikofaktor?</i> .....	84
4.4	VERSUCHSREIHE ZUR UNTERERNÄHRUNG .....	85
4.4.1	<i>Versuch 1: Vorversuch zur Erprobung der Entwicklung chronischer Unterernährung</i> .....	85
4.4.2	<i>Versuch 2: Einfluss chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung ; gleiches Alter der Tiere beider Gruppen bei ACI</i> .....	87
4.4.3	<i>Versuch 3: Einfluss von chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Gewicht der Tiere beider Gruppen bei ACI</i> .....	88
4.4.4	<i>Präoperative Unterernährung als Risikofaktor?</i> .....	89
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>93</b>
6.1	EIGENE PUBLIKATIONEN .....	117
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>118</b>
7.1	CURRICULUM VITAE .....	119
7.2	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....	121
7.3	DANKSAGUNG .....	122

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis: Bedeutung und Definition

Etwa 215 000 Menschen sterben jedes Jahr in den USA an dem Krankheitsbild Sepsis.<sup>5</sup> Dies sind 9,3% aller Todesfälle und diese Zahl entspricht der jährlichen Anzahl von Sterbefällen am akuten Myokardinfarkt.<sup>134</sup> Damit steht die Sepsis an zehnter Stelle der häufigsten Todesursachen in den USA.<sup>118</sup> Im Bereich der Intensivmedizin ist sie gar die häufigste Ursache für letale Verläufe.<sup>32;92</sup> Weltweit ist eine jährliche Sepsisinzidenz von 1,8 Millionen dokumentiert, allerdings wird die tatsächliche Inzidenz von den Mitgliedern der „Surviving Sepsis Campaign“ auf etwa 18 Millionen geschätzt.<sup>175</sup>

Diese Daten machen deutlich, dass auch heute noch, selbst nach jahrzehntelanger intensiver Forschung, die Sepsis nach wie vor ein zentrales Problem in der ärztlichen Praxis darstellt. Viele Studien haben, insbesondere in letzter Zeit, erheblich zum Verständnis des komplexen Krankheitsbildes beigetragen. Dennoch gibt es weiterhin viele offene Fragen, nicht verstandene Zusammenhänge und erhebliche Kontroversen. Trotz etlicher vielversprechender Ansätze in Tierexperimenten ist es bis heute zu keinem Durchbruch in der Therapie der Sepsis gekommen.<sup>92</sup> Die Gesamtmortalität bei septischem Schock wird von Friedman et al. mit annähernd 50% angegeben.<sup>70</sup> Eine epidemiologische Studie aus Frankreich berichtete über eine Mortalität bei septischem Schock von 60%.<sup>7</sup> In der bisher größten epidemiologischen Studie berichteten Martin et al. sogar von einer Mortalität von 70% bei schwerer Sepsis und septischem Schock.<sup>118</sup> Zwar ist die Gesamtmortalität aller hospitalisierten Patienten mit Sepsis zwischen den Jahren 1979 und 2000 von 27,8 auf 17,9% signifikant zurückgegangen. Allerdings ist dies weniger auf neue spezifische Sepsistherapien zurückzuführen, als vielmehr auf nichtspezifische Verbesserungen in der Intensivmedizin.<sup>118</sup> Diese umfassen unter anderem Verbesserungen in der Beatmung, der Kreislauftherapie und den Organersatzverfahren. Im Gegenzug muss erwähnt werden, dass die Inzidenz der Sepsis jährlich um 8,7% ansteigt und somit trotz zurückgegangener Mortalität die Anzahl von Todesfällen am Krankheitsbild Sepsis von Jahr zu Jahr ansteigt.<sup>118</sup>

Lange Zeit bestand keine einheitliche Definition zur Sepsis bzw. der vielfältigen zugehörigen Begriffe wie Septikämie, Bakteriämie, SIRS, schwere Sepsis, septischer Schock und Multiorganversagen. Diese Begriffe wurden uneinheitlich, teilweise synonym gebraucht und komplizierten somit die Bewertung von Studien auf diesem Gebiet.<sup>124</sup> In einer Konsensuskonferenz im Jahre 1991 in den USA, wurden Definitionen zu den verschiedenen Begriffen erarbeitet, welche weltweite Akzeptanz erfuhren -wenn auch nicht gänzlich kritiklos-<sup>10</sup> und auch heute noch die am häufigsten von Klinikern und Wissenschaftlern gebrauchten Definitionen auf dem Gebiet der Sepsis darstellen.<sup>124</sup> Im Folgenden sollen die wichtigsten Definitionen kurz aufgeführt werden:

- **Bakteriämie:** Die Anwesenheit von vitalen Bakterien im Blut.
- **SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome):** Die systemische Entzündungsreaktion auf eine Vielfalt von schweren klinischen Insulten, die sich mit zwei oder mehreren der folgenden Faktoren manifestiert:
  - Körpertemperatur >38°C oder <36°C
  - Herzfrequenz >90/min
  - Atemfrequenz >20/min oder PaCO<sub>2</sub> <32 mmHg
  - Leukozytenzahl >12 000/mm<sup>3</sup>, <4000/mm<sup>3</sup>  
oder >10% unreife (stabkernige) Leukozyten
- **Sepsis:** Die systemische Reaktion auf eine Infektion. Sie entspricht dem SIRS mit zusätzlich nachgewiesener infektiöser Ursache.
- **Schwere Sepsis:** Sepsis assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie. Minderperfusion und Durchblutungsanomalien können unter anderem resultieren in einer Laktatazidose, Oligurie, oder einer akuten Bewusstseinsbeeinträchtigung.
- **Septischer Schock:** Schwere Sepsis mit Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution.

- **Multiorganversagen:** Das Vorliegen beeinträchtigter Organfunktionen bei einem akut kranken Patienten, bei dem die Hämostase nicht ohne Intervention aufrechterhalten werden kann.

Von der Verwendung des Begriffes Septikämie wird abgeraten.

Es ist zu bemerken, dass diese Sepsisdefinitionen lediglich auf klinischen Faktoren beruhen und nicht über die Pathophysiologie erfolgen.<sup>1;6</sup> Vincent kritisierte das Konzept des SIRS als zu wenig spezifisch und übersensitiv, bemängelte außerdem die fehlende Einbindung der Pathophysiologie und den unklaren Benefit für den Patienten.<sup>192</sup> Weiterhin wird die Sepsisdefinition dadurch kompliziert, dass sicherlich eine gewisse Variabilität im zeitlichen Verlauf vorliegt.<sup>101</sup> Es gibt Hinweise, die eine hierarchische Anordnung der Zustände SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock als klinisch fortschreitende Stadien eines systemischen entzündlichen Prozesses vermuten lassen.<sup>153</sup> Im Jahre 2001 wurde erneut von den Mitgliedern des „American College of Chest Physicians“ eine Konferenz zur Definition der Sepsis abgehalten, um die zehn Jahre zuvor erarbeiteten Definitionen zu reevaluieren. Man kam zu dem Ergebnis, dass die oben aufgeführten Definitionen für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock weiterhin volle Gültigkeit haben.<sup>107</sup> Aber es wurde durchaus erkannt, dass das SIRS als diagnostisches Hilfsmittel zu unspezifisch und übersensitiv ist. Eine stetig steigende Zahl an experimentellen Studien macht Hoffnung, dass in Zukunft möglicherweise die klinisch basierten Definitionen durch Definitionen anhand von biochemischen und immunologischen Markern abgelöst werden können. Dies würde einen großen Fortschritt für die Diagnostizierung der Sepsis im klinischen Alltag bedeuten. Allerdings fehlt es heute noch an Studien und Kenntnissen, um einen solchen Wandel durchzuführen zu können.<sup>107;117;132</sup>



## 1.2 Aktueller Stand der Sepsisforschung

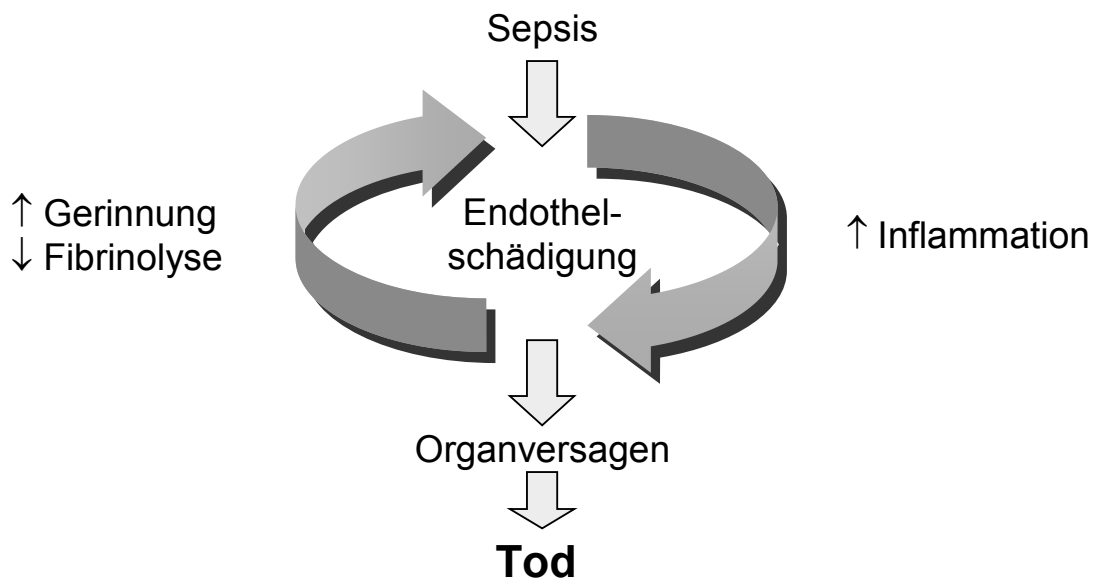
Die anfangs zitierten Daten zur Inzidenz der Sepsis entstammen einer im Jahre 2001 von Angus et al. publizierten epidemiologischen Studie zur schweren Sepsis,<sup>5</sup> sowie einer epidemiologischen Studie von Martin et al. aus dem Jahre 2003.<sup>118</sup> Letztere ist die zurzeit größte verfügbare Studie zur Epidemiologie der Sepsis. 750 Millionen Krankenhausentlassungen aus den Jahren 1979 bis 2000 in den USA wurden ausgewertet. Dabei fanden Martin et al. über zehn Millionen Fälle von septischen Komplikationen. Dies entspricht 1,3% aller Krankenhauseinweisungen. In der Studie von Angus et al. waren 21% aller Fälle chirurgische Patienten, genau die Untergruppe, auf die sich die vorliegende Dissertation insbesondere bezieht. 51% aller Patienten wurden auf der Intensivstation versorgt. Die Gesamtmortalität wurde mit 28,6% angegeben, in der Studie von Martin et al. mit 17,9%. Dabei zeigte die Mortalität in beiden Studien eine deutliche Abhängigkeit vom Alter der Patienten und vorliegenden Co-Morbiditäten. Nicht überraschend ist der Befund, dass die Mortalität mit steigender Anzahl versagender Organe ansteigt. Insgesamt traten bei einem Drittel aller Sepsis-Patienten Organversagen auf. Bei Versagen von drei oder mehr Organen (= schwere Sepsis bzw. septischer Schock) betrug die Mortalitätsrate 70%. Die am häufigsten versagenden Organe sind die Lunge und die Nieren. Erwähnenswert ist weiterhin der von Martin et al. gemessene Anstieg der Sepsis-Inzidenz um 8,7% pro Jahr. Dies wird unter anderem auf den unproportionalen Anstieg der älteren Bevölkerung und der erhöhten Inzidenz in dieser Subgruppe zurückgeführt.<sup>76</sup> In der Tat zeigte sich innerhalb der durch die Studie erfassten 22 Jahre, ein Anstieg des Durchschnittsalters der Erkrankten von 57,4 auf 60,8 Jahre. Zusätzlich sind eine zunehmende Anzahl invasiver Maßnahmen an Patienten, der zunehmende Gebrauch immunsuppressiver Medikamente, sowie Chemotherapien und Transplantationen, als auch ein Anstieg von HIV Infektionen und Antibiotikaresistenzen verantwortlich zu machen. Dies gibt Anlass zur Sorge, dass die Bedeutung der Sepsis in Zukunft noch weiter zunehmen wird.<sup>5;118</sup>

In einem Review beschreiben Hotchkiss und Karl ausführlich den aktuellen Stand der Forschung und zeigen auf, wie sich das Verständnis der Sepsis in den letzten Jahren gewandelt hat.<sup>92</sup> So wird berichtet, dass die ursprünglich von Lewis Thomas 1972

verfasste Theorie, dass der eigentliche Krankheitsverlauf der Sepsis nicht auf der Infektion selber, sondern auf der überschießenden Abwehrreaktion des Körpers beruhe („the microorganisms that seem to have it in for us ... turn out ... to be rather more like bystanders ... It is our response to their presence that makes the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful ... that we are more in danger from them than the invaders.“)<sup>92</sup> mehr und mehr verlassen wird.<sup>135;193;204</sup> Die Vorstellung, dass eine überschießende, unkontrollierte Immunreaktion des Körpers mit übersteigter Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen für den septischen Prozess verantwortlich sei, hat zu zahlreichen Versuchen geführt, das Überleben mit immunsupprimierenden Substanzen zu verbessern. So wurde unter anderem der Effekt von Kortikosteroiden,<sup>33</sup> von Antiendotoxin-Antikörpern,<sup>205</sup> von Tumornekrose-Faktor-(TNF)-Antagonisten<sup>2;64</sup> und Interleukin-1-Rezeptorantagonisten<sup>65</sup> untersucht. Bernard et al. evaluierten den Effekt von Ibuprofen auf den septischen Verlauf.<sup>26</sup> Die meisten dieser therapeutischen Ansätze zeigten vielversprechende Resultate in Tierversuchen, aber durchweg enttäuschende Ergebnisse bei anschließenden klinischen Studien am Menschen.<sup>88;204</sup> Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Theorie, die Sepsis basiere auf einer unkontrollierten Überreaktion des Organismus, welche primär aus Beobachtungen im Tierexperiment herrührte, nicht ohne weiteres auf die Situation beim Menschen übertragbar ist.<sup>52;63</sup> Laut einiger klinischer Studien ist die unkontrollierte systemische inflammatorische Überreaktion in der Tat nicht so häufig, wie zuvor angenommen.<sup>51;139</sup> Es wurde sogar über eine Verschlechterung der Überlebensrate bei Eingreifen in die Immunreaktion, beispielsweise mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten, berichtet.<sup>59</sup> Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass Zytokine durchaus auch günstige Effekte im Verlauf der Sepsis haben und ihre Blockung somit nicht immer sinnvoll erscheint.

In letzter Zeit taucht immer häufiger der Zustand der Immunsuppression in der Diskussion um die Pathogenese der Sepsis auf.<sup>92</sup> Oberholzer et al. postulierten, die Sepsis sei möglicherweise initial durch einen Anstieg von Entzündungsmediatoren gekennzeichnet, dass aber im weiteren Verlauf ein Zustand der Immunsuppression vorliegen würde.<sup>140</sup> Für die postoperative Sepsis nach größeren viszeralchirurgischen Eingriffen beschrieben Weighardt et al. einen unmittelbaren Defekt in der Produktion von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten.<sup>195</sup> Es wurde eine Korrelation zwischen dem Überleben septischer Patienten und der

Wiederherstellung der pro-inflammatorischen und nicht der anti-inflammatorischen Reaktion gefunden. Weighardt et al. schlussfolgerten, dass eine Immunsuppression am ehesten die primäre und keine kompensatorische Reaktion auf einen inflammatorischen Insult sei.<sup>195</sup> Tschakowsky et al. schlussfolgern aus Ihrer Studie über die monozytäre HLA-DR Expression im Verlauf der Sepsis, dass eher kein biphasischer Entzündungsverlauf stattfindet, sondern schon initial pro- und antiinflammatorische Prozesse nebeneinander ablaufen.<sup>183</sup> Zusammenfassend spekulierten Hotchkiss und Karl, dass möglicherweise der Schlüssel zur erfolgreichen Sepsistherapie darin bestehe, den aktuellen Immunstatus des Patienten in Relation zur Kontrolle der Infektion zu identifizieren. Einige Patienten haben eine exzessive und schädigende Immunantwort mit hohen Spiegeln an proinflammatorischen Zytokinen, während andere eine insuffiziente proinflammatorische Zytokinantwort aufweisen. Somit würde die Therapie darin bestehen, das Immunsystem entweder zu aktivieren oder zu unterdrücken, ganz abhängig vom Stadium der aktuellen Immunantwort.<sup>158</sup> Erheblichen Vorschub hat dem Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis die Erkenntnis gegeben, dass Inflammation und Gerinnungsaktivierung eng miteinander verknüpft sind. Thrombin wird hier als wichtiges Bindeglied angesehen. Entzündungszellen und proinflammatorische Zytokine steigern die Thrombinproduktion; Thrombin wiederum fördert die Leukozytenadhäsion, induziert die Produktion von Plättchen aktivierendem Faktor und treibt inflammatorische Abläufe via verschiedenster Mechanismen voran.<sup>138</sup> Zusätzlich sind oft die Spiegel der wichtigsten physiologischen Gerinnungshemmer (unter anderem Antithrombin und das Protein C System) bei septischen Patienten erniedrigt.<sup>189</sup> Healy fasst das derzeitige Verständnis über den Krankheitsverlauf zusammen als Verlust der Hämostase zwischen Entzündung, Gerinnung und Fibrinolyse<sup>88</sup> (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Das aktuelle Verständnis der Sepsis-Pathophysiologie**

Dargestellt ist der heute besser verstandene Einfluss der Sepsis auf Inflammation, Gerinnung und Fibrinolyse und deren Zusammenwirken im Verlauf der Erkrankung. Bisher hat man sich auf das inflammatorische Geschehen als den dominierenden Prozess in der Sepsiskaskade konzentriert, der letztendlich zum Organversagen führt. Neuere Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs, des Ausmaßes und der Auswirkungen von Hämostasestörungen auf das Endothel haben aber die zentrale Bedeutung dieser Imbalance bei der Sepsis gezeigt. Sie manifestiert sich als Gerinnungsstörung und in Form von mikrovaskulären Thrombosen und kann letztendlich der ursächliche Faktor für Organversagen und Tod sein. (Mit freundlicher Genehmigung entnommen dem Dia-Service „Beeinflussung der Gerinnung: Der Weg aus der Sepsis?“ der Lilly Pharma Holding GmbH, Bad Homburg.)

Trotz aller Enttäuschungen in der Forschung an geeigneten Sepsistherapien gibt es auch einige erfreuliche Ergebnisse und neue Therapieansätze zu verzeichnen. Insbesondere die Studie von Bernard et al. zum Effekt von aktiviertem Protein C hat zum geschilderten neuen Verständnis der Sepsis beigetragen. Bernard et al. berichteten über eine signifikante Verbesserung des Überlebens bei Patienten mit schwerer Sepsis von 30,8% auf 24,7% nach Behandlung mit Drotrecogin alfa (rekombinantes aktiviertes Protein C).<sup>25;120</sup> Aktiviertes Protein C ist damit eine von bisher nur zwei Substanzen, die ihre Wirksamkeit bei septischen Prozessen in klinischen Studien beweisen konnten. Es wird vermutet, dass die Wirksamkeit dieses

Antikoagulanzen auf einer Rückkopplung zwischen Gerinnungssystem und Entzündungskaskade beruht.<sup>120</sup> Außerdem scheint aktiviertes Protein C auch direkte antiinflammatorische Eigenschaften zu haben. Diese schließen die Blockierung der Produktion von Zytokinen durch Monozyten und die Blockierung von Zelladhäsionen ein. Allerdings birgt die Therapie mit aktiviertem Protein C auch das nicht unerhebliche Risiko der Hämorrhagie.<sup>194</sup> Aus diesem Grunde und dem der enormen Therapiekosten ist aktiviertes Protein C zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur für die Therapie bei Patienten mit schwerer Sepsis mit starker Organbeeinträchtigung und hoher Versterbenswahrscheinlichkeit zugelassen.<sup>92;196</sup> Es besteht derzeit noch große Uneinigkeit darüber, welche Patienten eine Therapie mit aktiviertem Protein C erhalten sollten.<sup>10;50;196</sup>

Die zweite Substanzgruppe, die in klinischen Studien erfolgreich getestet wurde, sind niedrig dosierte Kortikosteroide (200-300mg Hydrokortison/Tag). Während hoch dosierte Kortikosteroide wirkungslos oder sogar schädlich in der Therapie der Sepsis sind,<sup>8;127</sup> haben zwei Metaanalysen aus dem Jahre 2004 einen eindeutigen Vorteil für Patienten im septischen Schock gezeigt, wenn diese eine niedrig dosierte Kortikosteroidtherapie erhielten.<sup>8;127</sup> Basierend auf diesen Studien scheint die Effektivität von Kortikosteroiden im septischen Schock vergleichbar mit der Effektivität von aktiviertem Protein C (APC) zu sein. Dies schürt abermals die Diskussion bezüglich der Indikation für APC, unter Berücksichtigung des sichereren Nebenwirkungsprofils der Steroide und deren erheblich niedrigeren Therapiekosten.<sup>50</sup>

Zwei weitere erwähnenswerte unspezifische Therapiekonzepte stellen die intensivierete Insulintherapie bei kritisch Kranken dar, sowie die frühe aggressive Volumensubstitution.

Van den Berghe et al. demonstrierten eine Reduktion von septischen Phasen bei kritisch Kranken und eine Reduktion der Mortalität bei Patienten mit Bakteriämie und solchen mit Multiorganversagen unter intensivierter Insulintherapie.<sup>187</sup> Unabhängig davon, ob ein Diabetes mellitus vorlag oder nicht, profitierten alle Patienten mit septischen Komplikationen von einem Blutzucker < 130mg/dl. Es ist nicht genau bekannt worauf dieser protektive Effekt beruht; vermutet wird aber eine verminderte Phagozytosefähigkeit von neutrophilen Granulozyten bei Hyperglykämie und ein möglicher antiapoptotischer Effekt von Insulin.<sup>73;188</sup>

Rivers et al. zeigten eine signifikante Verbesserung des Überlebens bei Optimierung der kardialen Vor- und Nachlast und Kontraktilität durch frühe aggressive Volumensubstitution.<sup>156</sup>

Eine umfassende Erarbeitung von aktuellen Therapieempfehlungen wurde kürzlich im Rahmen der „Surviving Sepsis Campaign“ von Dellinger et al. publiziert.<sup>53</sup>

### 1.3 Die Bedeutung von G-CSF

In einer Arbeit von Lorenz et al. (1994) wurde ein weiteres viel versprechendes Therapiekonzept beschrieben, das in Zukunft Bedeutung in der Sepsistherapie gewinnen könnte.<sup>110</sup> Es wurde gezeigt, dass durch eine präoperativ durchgeführte Prophylaxe mit Granulozyten-Colonie-Stimulierendem-Faktor (G-CSF) der Verlauf einer postoperativen Sepsis positiv beeinflusst werden kann. Im Tierexperiment konnte die Mortalität um weitere 40% im Vergleich zu alleiniger Antibiotikaprophylaxe gesenkt werden.

G-CSF gehört zu einer Gruppe von Mediatoren, die mehr und mehr in das Zentrum des Forschungsinteresses vorrücken: die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Von diesen hat G-CSF, welches 1971 entdeckt wurde,<sup>172</sup> die größte klinische Bedeutung erlangt.<sup>17</sup> Es wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen und Granulozyten sezerniert. Diese Synthese kann sowohl durch bakterielles Endotoxin und LPS induziert werden, als auch durch TNF- $\alpha$ , IL-1 und GM-CSF, einem weiteren hämatopoetischen Wachstumsfaktor. Prostaglandin E2 hemmt die Synthese von G-CSF. G-CSF bewirkt eine temporäre Erhöhung der Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut und Gewebe. Dies geschieht durch eine Verminderung der Reifungszeit im Knochenmark und durch die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus Speicherpools.<sup>17;94</sup> Ein weiterer wichtiger Effekt des G-CSFs ist eine Steigerung der antimikrobiellen Funktion der neutrophilen Granulozyten (PMN's), durch Erhöhung der Migrations- und Phagozytoserate, sowie einer gesteigerten Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radikalen. Dies ist eine Erklärung für den Effekt des G-CSFs bei infektiösen Krankheiten. Eine weitere Erklärung, ist die Fähigkeit

von G-CSF, die Apoptose von Granulozyten zu unterdrücken.<sup>108</sup> Eine gesteigerte Apoptoserate von Lymphozyten und Granulozyten in der Anfangsphase der Sepsis, spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des septischen Schocks.<sup>106</sup> Außerdem supprimiert G-CSF die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6.<sup>14;17;37;49;79;87;110</sup> Auf der anderen Seite stimuliert es die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen.<sup>37;87</sup> Somit vereint G-CSF anti-infektiöse als auch anti-inflammatorische Eigenschaften; ein einzigartiges pharmakodynamisches Profil.<sup>34</sup>

Derzeit wird G-CSF, welches als Filgrastim (nicht glykosyliert) und als Lenograstim (glykosyliert) Verwendung findet, zur Vermeidung und Therapie von Neutropenien und zur Verbesserung der Lebensqualität, hauptsächlich bei Karzinompatienten, welche eine Hochdosis-Chemotherapie erhalten, eingesetzt.<sup>77</sup> Außerdem wird es zur Stammzellmobilisation appliziert.<sup>61</sup>

Auch hat G-CSF in einigen infektiösen Krankheitsbildern positive Auswirkungen bewiesen, so zum Beispiel bei Infektionen des diabetischen Fußes<sup>24;80</sup> und bei der neutropenischen Pneumonie.<sup>202</sup> Bisher sind keine bedeutsamen Nebenwirkungen einer G-CSF Therapie beobachtet worden.<sup>86</sup>

Wie schon erwähnt, verlangt das veränderte Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis neue Therapieansätze. Die rein antiinflammatorischen Ansätze haben keine Erfolge erbracht. Vielmehr scheint im Verlauf des Krankheitsbildes eine Immunsuppression vorzuliegen, die es dem Organismus unmöglich macht, die Pathogene zu eliminieren.<sup>92</sup> Daher erscheint es nur sinnvoll, diejenigen Methoden experimentell zu evaluieren, die zum Ziel haben, das Immunsystem zu unterstützen.<sup>135;140;204</sup>

G-CSF mit seiner immunstimulatorischen Wirkung auf den Organismus wird dieser Forderung gerecht. Die aufgeführten Studien zeigen, dass G-CSF das Potential hat, das Immunsystem in seiner Fähigkeit Pathogene zu eliminieren, zu unterstützen. In Tierexperimenten wurden die positiven Auswirkungen auf die Sepsismortalität gezeigt. Eine prospektive klinische multizentrische Studie zur Verbesserung des postoperativen Outcomes durch perioperative Prophylaxe mit G-CSF bei Patienten mit Operation auf Grund eines kolorektalen Karzinoms und erhöhtem operativen

Risiko (ASA 3 und 4), ist jüngst zu Ende gegangen.<sup>18;111;176</sup> In die Studie wurden 80 Patienten eingeschlossen. Durch eine Prophylaxe mit G-CSF in Kombination mit Cefuroxim/Metronidazol konnte die Lebensqualität der Patienten verbessert und die Infektionsrate sowie die Krankenhausliegezeit reduziert werden.<sup>15</sup>

Weitere Studien zur Wirkung von G-CSF müssen durchgeführt werden, um tiefgreifende Kenntnisse über die Wirkung bei infektiösen Krankheitsbildern und speziell bei Sepsis zu gewinnen. Insbesondere scheint es sinnvoll, den Effekt von G-CSF in Wechselwirkung mit weiteren Faktoren, wie weiteren Pharmaka aber auch bestimmten Risikofaktoren bzw. Risikokonstellationen, zu erforschen. Diese Forderung wird durch die Beobachtung bestärkt, dass G-CSF nicht in Wechselwirkung mit jedem klinisch verwendeten Antibiotikum, bzw. jeder Antibiotikakombination, eine optimale Wirkung erzielt.<sup>13;14;20</sup> So zeigte eine G-CSF Prophylaxe im Tiermodell eine deutliche Verbesserung des Überlebens bei postoperativer Sepsis in Kombination mit Cefuroxim/Metronidazol in klinisch gebräuchlicher Dosierung (10/3,5mg/kg KG). Kein signifikanter Unterschied hingegen wurde bei Verwendung der Antibiotikakombination Cefotaxim/Metronidazol gefunden.<sup>14</sup> Dies macht die Notwendigkeit deutlich, die Wechselwirkung von G-CSF mit anderen Faktoren zu untersuchen, um optimalen Bedingungen für klinische Studien mit G-CSF zu schaffen. Nur so kann wenig aussagekräftigen Resultaten vorgebeugt werden. Unter anderem hierzu soll die vorliegende Studie einen Beitrag leisten.

#### **1.4 Risikofaktoren für ein schlechtes Sepsisoutcome**

Die Mortalität des septischen Schocks wird in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich angegeben. Mortalitätsraten zwischen 30 und 80% sind berichtet worden. Friedman et al. schlossen in einer Metaanalyse auf eine Gesamtmortalität von 49,7%.<sup>70</sup>

Unabhängig von der genauen Mortalitätsrate -diese schwankt selbstverständlich in verschiedenen Studien aufgrund unterschiedlicher Patientenkollektive- ist es unstrittig, dass die Mortalität der Sepsis bzw. des septischen Schocks sehr hoch ist.



Nur wenige andere Krankheitsbilder weisen heute noch eine derart hohe Mortalität auf.

Zwangsläufig stellt sich die Frage, welches die Risikofaktoren für ein schlechtes Outcome sind. Die Kenntnis solcher, bzw. die Kenntnis über die relative Bedeutung verschiedener prognostischer Faktoren ist von entscheidender Wichtigkeit. Sie sind hilfreich in der Einschätzung, in welchem Ausmaß neue Therapiekonzepte den Krankheitsverlauf bestimmter Patientenpopulationen beeinflussen können. Daher ist die Kenntnis prognostischer Faktoren und Risikofaktoren nicht nur für den klinischen Alltag, sondern insbesondere auch in der Planung klinischer Studien von Bedeutung.<sup>35</sup>

Einige Risikofaktoren werden immer wieder in verschiedensten Studien erwähnt. Dazu gehören die inadäquate Anwendung von Antibiotika, zusätzlich vorliegende Krankheiten, die Quelle und Art der Infektion, das Vorliegen eines Schockzustandes, der Bedarf an Vasopressoren, Multiorganversagen und Neutropenie.<sup>12</sup>

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine unterschiedliche Mortalität bei verschiedener mikrobieller Genese der Sepsis. So scheinen Infektionen mit bestimmten Candida- und Enterokokkenstämmen die höchste Mortalität aufzuweisen, während Infektionen mit koagulase-negativen Staphylokokken mit der niedrigsten Mortalitätsrate assoziiert sind.<sup>152</sup> Auch ist der Ort der ursächlichen Infektion ein prognostischer Faktor für die sepsisassoziierte Mortalität. Infektionen ausgehend von einem intraabdominellen Lokus, oder von den unteren Atemwegen, sind mit einer hohen Mortalität verbunden.<sup>155</sup>

In einer großen Studie setzten sich Brun-Buisson et al. unter anderem das Ziel Risikofaktoren für ein verschlechtertes Überleben bei Sepsis zu identifizieren.<sup>35</sup> Die Autoren beobachteten eine Non-Konstanz der Risikofaktoren im Verlauf der Krankheit. Sie unterteilten ihre Ergebnisse daher in Risikofaktoren für frühe Mortalität (Tod < 3 Tage nach Verlegung auf die Intensivstation) und späte Mortalität (Tod > 3 Tage nach Verlegung auf die Intensivstation). Am stärksten war in der Studie die ansteigende Anzahl versagender Organe mit früher Mortalität assoziiert. Weiterhin zeigten ein arterieller pH < 7,33, das Vorliegen eines Schockzustandes und eine hohe Punktzahl im SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II)<sup>105</sup> eine Assoziation mit früher Mortalität. Zusätzliche Risikofaktoren für späte Mortalität (> 3 Tage) waren die Schwere von Komorbiditäten, vorbestehende Organschäden, vorliegende Hypothermie (< 36°C) und das Vorliegen von mehreren

Infektionsherden. Die Autoren fassen Ihre Beobachtungen zusammen mit der Feststellung, dass der frühe Tod eher mit der Schwere der Reaktion des Organismus auf die Infektion assoziiert zu sein scheint, während späteres Versterben am stärksten mit den Charakteristika der Komorbiditäten zusammenhänge.

Entgegen der oben erwähnten Studien, fanden Brun-Buisson et al. weder eine Assoziation der frühen Sepsismortalität mit der Art des infizierenden Organismus noch mit der Art der Antibiotikatherapie.<sup>35</sup>

In einer Studie von Sasse et al. werden als negative prognostische Faktoren für das Langzeitüberleben das Vorliegen einer HIV-Infektion, sowie die Erkrankung an einem malignen Tumor erwähnt.<sup>165</sup> Dass das Vorliegen eines Malignoms mit erhöhter Sepsismortalität verknüpft zu sein scheint, ist schon häufiger in der Literatur beschrieben worden.<sup>111</sup>

Einige Studien geben weiterhin Hinweise auf ein genetisches determiniertes Risiko. So hat sich beispielsweise das Vorliegen eines TNF $\alpha$  Polymorphismus als negativer prognostischer Faktor bezüglich des Überlebens der Sepsis erwiesen.<sup>128</sup> Die Rolle des Geschlechts als genetische Prädisposition für erhöhte Mortalität wird sehr kontrovers diskutiert. Es wurde vereinzelt berichtet, dass die Inzidenz des septischen Schocks und die Mortalität bei Frauen geringer sei.<sup>5;6;93</sup> In der epidemiologischen Studie von Martin et al. wurde von einer niedrigeren Sepsisinzidenz bei Frauen, sowie einer Entwicklung von Sepsis früher im Leben berichtet. Die Sepsismortalität hingegen unterschied sich nicht zwischen Männern und Frauen.<sup>118</sup> Allerdings berichteten Martin et al. über einen Unterschied in der Sepsismortalität bezüglich der Rasse. So war die Mortalität am höchsten bei der weißen und schwarzen Bevölkerung der USA. Innerhalb dieser Subgruppe wiederum war die Mortalität am höchsten bei schwarzen Männern.<sup>118</sup>

Ein wichtiger, bis jetzt nicht erwähnter Risikofaktor, ist das Alter des Patienten. Angus et al. berichteten über eine annähernd vierfach höhere Mortalität bei Patienten über 85 Lebensjahren gegenüber Kindern.<sup>5</sup> Eine andere Studie ergab sogar ein 13fach geringeres Überleben bei älteren Menschen gegenüber Kindern mit Pneumokokken-Bakteriämie.<sup>129</sup>

Zwar sind alle Risikofaktoren wichtig in der Planung neuer klinischer Studien, nicht alle tragen aber die gleiche klinische Bedeutung. Es liegt auf der Hand, dass klinisch

beeinflussbaren Risikofaktoren besondere praktische Wichtigkeit zukommt. Beispielsweise kann das Team einer Intensivstation oder eines Operationssaales nichts an dem Alter des Patienten ändern. Hohes Alter, als identifizierter Risikofaktor für ein verschlechtertes Überleben bei septischen Krankheitsbildern, ist eine klinisch nicht modifizierbare Größe. Ebenso verhält es sich bei den meisten der aufgelisteten negativen prognostischen Faktoren. Demgegenüber existieren durchaus Risikofaktoren, durch deren Vermeidung bzw. Abmilderung der klinisch tätige Arzt eine Verbesserung des Outcome des Patienten bewirken kann. Diesen Zuständen muss große Aufmerksamkeit gewidmet werden. Beispielhaft seien die initiale Anwendung von ungeeigneten Antibiotika, oder auch eine insuffiziente chirurgische Herdsanierung genannt.<sup>6</sup>

Zwei weitere klinisch bedingt modifizierbare und deshalb wichtige Risikofaktoren für verschlechtertes Sepsisüberleben, werden in der vorliegenden Dissertation genauer evaluiert: die perioperative Hypothermie und die präoperative Unterernährung. Beide Zustände werden bezüglich Ihrer Eigenschaften als Risikofaktoren in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

Im Folgenden soll auf beide Faktoren gesondert eingegangen werden.

## **1.5 Hypothermie als Risikofaktor?**

Es gibt keine einheitliche Definition für den Begriff Hypothermie bzw. für die verschiedenen Grade der Hypothermie.<sup>171</sup> In der Literatur werden die Termini Hypothermie, milde Hypothermie und moderate Hypothermie uneinheitlich gebraucht. Eine oft verwendete Einteilung der Grade der Unterkühlung ist die nach Safar et al.: Hypothermie < 36°C (Körperkerntemperatur), milde Hypothermie 32-36°C, moderate Hypothermie 28-32°C.<sup>162</sup> Diese Einteilung wird in der vorliegenden Dissertation zugrunde gelegt.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass es bei mehr als 50% aller Operationen zu einem ungewollten Abfall der Körperkerntemperatur des Patienten um mehr als 2°C kommt.<sup>142</sup> Diese Tatsache wurde lange Jahre unterschätzt und nicht ausreichend

beachtet. Die Gründe für eine akzidentelle perioperative Hypothermie sind vielfältig. Offensichtlich spielen die klimatischen Verhältnisse im Operationssaal eine wichtige Rolle. Die Raumtemperatur beträgt gewöhnlich weniger als 28°C, welches die Indifferenztemperatur des unbedeckten Erwachsenen darstellt. Intraoperative Wärmeverluste kommen durch vier Faktoren zustande: 1) Konvektion („Wärmeströmung“), 2) Radiation („Wärmestrahlung“), 3) Konduktion („Wärmeleitung“) und 4) Evaporation („Verdunstung“). Im Gegenzug stellt es sich oft als schwierig dar, während der Operation eine ausreichend große Oberfläche des Patienten zu bedecken, um für suffiziente Wärmeisolation zu sorgen. Bei großen Eingriffen wie offenen abdominalen Operationen, kommen zusätzliche evaporative Wärmeverluste hinzu.<sup>142</sup>

Ein besonders wichtiger Grund für ungewollte perioperative Unterkühlung ist der Einfluss der Narkose. So verhindert die Anästhesie die endogene Wärmebildung durch willkürliche Skelettmuskelaktivität. Zusätzlich wird die basale metabolische Aktivität gesenkt und die autonome Temperaturregulation beeinträchtigt. Die Kältereaktionsschwelle wird herabgesetzt.<sup>142</sup>

Der Abfall der Körperkerntemperatur während einer Anästhesie wird in drei Phasen unterteilt.<sup>170</sup> Der rascheste Abfall erfolgt in der ersten Phase. In dieser etwa 60 Minuten dauernden Phase nach Einleitung der Narkose, kommt es zu einer Umverteilung von Wärme aus dem Körperkern in die Körperschale. Diese resultiert aus einer anästhetikabedingten Verminderung des peripheren Vasotonus, der unter physiologischen Bedingungen ein Temperaturgefälle von Körperschale zum Körperkern aufrechterhält. Die Abnahme der Körperkerntemperatur durch diesen Wärmetransfer von zentral nach peripher beträgt etwa 1,5°C. Wärmeverluste an die Umgebung tragen in dieser ersten Phase nur zu einem geringen Teil zur Absenkung der Körperkerntemperatur bei. In Phase 2 allerdings resultiert das weitere Absinken der Kerntemperatur überwiegend aus diesen Verlusten an die Umgebung. Im Vergleich zu Phase 1 erfolgt der Temperaturabfall hier jedoch erheblich langsamer. Zu Beginn der dritten Phase wird die während der Anästhesie erniedrigte Schwellentemperatur für die Auslösung von Kältegegenregulationsmechanismen erreicht, und es kommt damit zu einem Kerntemperaturplateau auf niedrigem Niveau.

Macario und Dexter identifizierten verschiedene Faktoren als Risikofaktoren für die Entwicklung intraoperativer Hypothermie.<sup>113</sup> Zu den Wichtigsten zählen eine niedrige Raumtemperatur des Operationssaales, das Vorliegen von Verbrennungen, eine niedrige Körpertemperatur vor der Operation und ein großer Blutverlust. Außerdem sind Neugeborene und alte Patienten besonders häufig von perioperativer Unterkühlung betroffen.

Nicht nur ungewollte Unterkühlung ist ein Grund für das Auftreten perioperativer Hypothermie. Vielmehr gibt es bestimmte Operationen, in denen gezielt eine Unterkühlung des Patienten induziert wird. Der Einsatz von induzierter Hypothermie ist kein neuer Gedanke. Schon Hippokrates hatte eine Kühlung von Verwundeten mit Schnee und Eis vorgeschlagen, um Blutungen zu reduzieren.<sup>146</sup> Klinisches Interesse an der induzierten Hypothermie begann in den 30er und 40er Jahren, zuerst bei Patienten mit Kopfverletzungen. Schon bald allerdings wurden diese Versuche wieder verworfen, aufgrund unkontrollierbarer Nebenwirkungen der Hypothermie und der schlechten Steuerbarkeit. In den frühen 80ern wurde das Konzept dann erneut aufgegriffen, nachdem Tierversuche zeigten, dass schon milde Hypothermie (32-35°C) vorteilhafte Effekte aufwies. Im Gegensatz zu der zuvor verwendeten tiefen Unterkühlung waren die Nebenwirkungen geringer und besser kontrollierbar.<sup>146</sup>

Insbesondere in der Neuro-, Herz- und Gefäßchirurgie macht man sich die neuro- und kardioprotektive Wirkung der Unterkühlung zunutze.<sup>91;146</sup> Das Ziel ist üblicherweise die Zeitgrenze für eine bestimmte Operation oder Prozedur, durch Dämpfung des Metabolismus und Schutz insbesondere des Gehirns und des Rückenmarks bei lokaler oder systemischer Unterbrechung der Zirkulation, heraufzusetzen. Beispielsweise haben Tierexperimente gezeigt, dass man die Aortenabklemmdauer unter dem Einsatz milder Hypothermie um das Zwei- bis Dreifache verlängern kann, ohne eine Paraplegie zu induzieren.<sup>157</sup>

Dieser zuerst in Tierexperimenten<sup>42;46</sup> beschriebene positive Effekt ist in vielen klinischen Studien bestätigt worden.<sup>44;91;116;161</sup> Nicht nur im operativen Bereich macht man sich deshalb die Neuroprotektion durch Unterkühlung zunutze, sondern auch bei Reanimationen,<sup>136;149;161</sup> Hirnverletzungen<sup>116</sup> und in der Traumatologie.<sup>180</sup>

Allerdings ist dieser benefitielle Einfluss von Unterkühlung weder völlig unumstritten anerkannt,<sup>27;45;146;181</sup> noch ist genau bekannt, auf welchem Mechanismus dieser Effekt beruht.<sup>179</sup> Polderman kommt in einem 2004 publizierten Review zu dem Ergebnis, dass der neuroprotektive Effekt der induzierten Hypothermie nicht nur auf die schon länger bekannte Dämpfung des zerebralen Metabolismus zurückzuführen sei. Vielmehr seien andere Mechanismen von wesentlich größerer Bedeutung. Unter anderem seien dies die reduzierte Apoptoserate von Neuronen unter Hypothermie, die Suppression der neuroexzitatorischen Kaskade durch Verbesserung der Ionenhomöostase, die Unterdrückung von ischämieinduzierten inflammatorischen Reaktionen und Zytokinausschüttung (siehe weiter unten), die Reduzierung freier Radikale, sowie eine Stabilisierung von zerebralen Zellmembranen.<sup>146</sup>

Neben der Neuro- und Kardioprotektion sind weitere positive Auswirkungen der therapeutischen Hypothermie beschrieben worden. So berichteten Villar und Slutsky von einem verbesserten Überleben von Patienten mit schwerem sepsisassoziierten ARDS, wenn diese einer induzierten Hypothermie (32-35°C) ausgesetzt waren.<sup>191</sup> Es muss aber erwähnt werden, dass diese Studie nicht randomisiert durchgeführt wurde und nur 19 Patienten umfasste. Die positive Wirkung erklären die Autoren mit dem durch Unterkühlung verminderten Sauerstoffbedarf der Gewebe. Zwei im Jahr 2003 publizierte Studien zeigten einen ähnlichen Effekt an Ratten.<sup>109;164</sup> In beiden Studien berichteten die Autoren über einen positiven Effekt von induzierter Hypothermie auf einen durch Endotoxin induzierten akuten Lungenschaden. Als mögliche Erklärung führen die Autoren beider Studien Ihre sehr ähnlichen Ergebnisse auf Zytokinebene an: die induzierte Hypothermie bewirkte eine Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine Il-1, IL-6 und TNF $\alpha$  in der Lunge, sowie eine gesteigerte Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.<sup>109;164</sup>

Verschiedene Studien beschreiben weiterhin einen positiven Einfluss auf das Outcome bei hämorrhagischem Schock.<sup>85;200;201</sup>

Lange Zeit hat man den negativen Effekten der Hypothermie kaum Beachtung geschenkt. Mittlerweile liegt aber eine Menge an Studien vor, die sich mit den Folgen bzw. Nebenwirkungen der induzierten und akzidentellen Unterkühlung beschäftigen. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die perioperative Hypothermie zahlreiche

Körperfunktionen und damit auch den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen kann.<sup>142;147</sup>

So berichteten Frank et al. über eine Assoziation von perioperativer Hypothermie und dem Auftreten schwerer kardiovaskulärer Komplikationen.<sup>67</sup> Ventrikuläre Tachykardien, Asystolien, instabile Angina pectoris und Myokardinfarkte waren bei Hochrisikopatienten mit einer um lediglich 1,3°C gesenkten Kerntemperatur dreifach häufiger zu finden.<sup>68</sup> Der Mechanismus dieser Wirkung ist nicht genau geklärt. Möglicherweise ist ein hypothermieassoziiertes Anstieg der Noradrenalin-Konzentration und des totalen peripheren Strömungswiderstandes verantwortlich zu machen.<sup>69</sup> Weiterhin wird eine Erniedrigung des Serum-Kaliumspiegels diskutiert.

Eine weitere Komplikation perioperativer Hypothermie ist eine Störung der Gerinnungsfunktion. Schmied et al. zeigten einen erhöhten Blutverlust und Fremdblutbedarf bei einer um nur 1,6°C erniedrigten perioperativen Kerntemperatur.<sup>166</sup> Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt auf einer Störung der Thrombozytenfunktion und einer verminderten Aktivität der Enzyme der Gerinnungskaskade beruht.<sup>84</sup>

Perioperative Unterkühlung führt zu einer Änderung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik multipler Arzneimittel, insbesondere aber zu einer Einschränkung der Metabolisationsrate von Hypnotika und Muskelrelaxantien.<sup>171</sup> Dies führt zu einer Verlängerung der Aufwachphase nach Operationen.

Weitere Nebenwirkungen der Hypothermie sind Flüssigkeitsverluste durch eine sogenannte hypothermieinduzierte Diurese, das Auftreten von Elektrolytentgleisungen, insbesondere eine Erniedrigung des Serum-Kaliumspiegels, sowie Hyperglykämien durch verminderte Insulinempfindlichkeit.<sup>147</sup>

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt perioperativer Hypothermie ist die Auswirkung auf das postoperative Wohlbefinden des Patienten. Postoperatives Frieren und Zittern wird meist als außerordentlich unangenehm, mitunter unangenehmer als Schmerzen, empfunden.<sup>103</sup>

Während über die beschriebenen Effekte der Hypothermie in der Literatur weitestgehend einheitliche Meinungen herrschen, ist die Auswirkung der Unterkühlung auf das Immunsystem ein Thema, das außerordentlich kontrovers diskutiert wird.

Eine sehr bekannte Studie von Kurz et al. zeigte, dass die Wundinfektionsrate nach kolonchirurgischen Eingriffen um das dreifache erhöht ist, bei einem Kerntemperaturunterschied zwischen den Gruppen von nur etwa 2°C.<sup>102</sup> Eine mögliche Erklärung sei eine hypothermiebedingte Vasokonstriktion, welche zu einem verminderten partiellen Sauerstoffdruck in den Geweben führt. Dies wiederum bedingt eine verminderte Bildung von Sauerstoffradikalen, da diese dem partiellen Sauerstoffdruck im Gewebe proportional ist. Freie Sauerstoffradikale tragen zur Elimination von Mikroben bei. Da dies primär in neutrophilen Granulozyten geschieht, verschlechtert die Hypothermie indirekt die Funktion der neutrophilen Granulozyten.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis in einer Studie von Flores-Maldonado et al.<sup>66</sup> Auch die Beobachtung, dass präoperatives Wärmen des Patienten zu einer Reduktion der Wundinfektionsrate führt, spricht für den negativen Effekt der perioperativen Hypothermie auf das Immunsystem.<sup>123</sup>

Eine Studie von Barone et al. allerdings zeigte keinerlei Unterschiede in der Wundinfektionsrate bei unterkühlten Patienten.<sup>11</sup> Somit kann die Frage nach der Wirkung von Hypothermie auf die Wundheilung nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden.

Für einen negativen Effekt der Unterkühlung auf das Immunsystem sprechen die Beobachtungen, dass eine erniedrigte Kerntemperatur die T-Zell abhängige Antikörperproduktion einschränkt.<sup>171</sup> Die Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten wird vermindert, ihre phagozytische Aktivität wird eingeschränkt und ebenso ihre chemotaktische Aktivität. Weiterhin ist die Phagozytosefähigkeit von Monozyten und Makrophagen bei Hypothermie vermindert.<sup>29-31;163</sup> Auch wurde gezeigt, dass die Aktivität von „natural killer cells“ gehemmt wird, womit der Metastasierung maligner Tumoren Vorschub geleistet wird.<sup>23</sup> Beilin et al. zeigten einen negativen Effekt von perioperativer milder Hypothermie auf das Immunsystem.<sup>22</sup> Berichtet wurde über eine supprimierte Lymphozytenaktivität und einen erniedrigten IL-2 Spiegel unter Hypothermieeinfluss. IL-2 spielt eine wichtige Rolle in vielen Prozessen der Immunabwehr. Einflüsse von Hypothermie auf die Zytokinproduktion des Organismus ist an etlichen weiteren Stellen beschrieben worden. Die meisten dieser Studien berichten über eine verminderte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$ , sowie einer gesteigerten



Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10.<sup>100;109;119;164</sup> Jedoch berichteten andere Autoren von einer gesteigerten TNF $\alpha$  und IL-1 Produktion unter Hypothermie.<sup>62</sup> Weiterhin scheint es einen Zusammenhang zu geben zwischen der Ausprägung der Unterkühlung und der Expression von Zytokinen. So wurde berichtet, dass eine Körpertemperatur von 32-33°C die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen hemmt, wogegen eine Temperatur von 34°C hierzu nicht imstande war.<sup>3</sup>

Eine wichtige, wenn auch statistisch nicht signifikante Beobachtung machten Clifton et al.<sup>44</sup> In der Studie war die Sepsisinzidenz bei vorliegender moderater Hypothermie größer als bei normothermen Patienten. In einer kürzlich publizierten großen klinischen Studie zur Wirkung von induzierter Hypothermie bei Patienten mit Subarachnoidalblutung (SAB), fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, außer einer statistisch signifikant erhöhten Inzidenz von Bakteriämien in der gekühlten Gruppe.<sup>181</sup>

Weiterhin wurde in einigen Studien von einer erhöhten Inzidenz von Pneumonien bei langzeitgekühlten (>48-72 Stunden) Patienten berichtet.<sup>167;173</sup>

Im Gegensatz dazu traten bei der von Marion et al. durchgeführten Studie mit moderater Hypothermie bei Kopfverletzungen keinerlei infektiöse Komplikationen auf.<sup>116</sup> Ebenso zeigten Wu et al. in einer Studie zur Wirkung von milder Hypothermie bei hämorrhagischem Schock in Ratten, dass die Unterkühlung keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion des Organismus hatte.<sup>201</sup> In einer schon erwähnten Untersuchung von Villar et al., fanden die Autoren sogar eine Verbesserung der Mortalitätsrate bei Patienten mit sepsisassoziiertem ARDS, wenn diese unterstützend mit milder Hypothermie behandelt wurden.<sup>191</sup> Die Autoren erklären diese Wirkung mit einer Verbesserung der Sauerstoffextraktion und einer Reduktion des Sauerstoffbedarfs der Gewebe unter erniedrigter Körperkerntemperatur. Sie schlagen deshalb die induzierte Hypothermie als mögliches Therapiekonzept auch bei Sepsis vor.

Von der akzidentellen und induzierten Hypothermie muss die spontane Hypothermie bei Sepsis abgegrenzt werden. Obwohl die häufigste Reaktion des Organismus auf eine Infektion Fieber ist, findet sich bei einem kleineren Prozentsatz der Patienten mit

Sepsis auch Normothermie oder Hypothermie. In einem Patientenkollektiv mit schwerer Sepsis fanden Clemmer et al. bei 9% der Patienten eine Körperkerntemperatur von  $<35,5^{\circ}\text{C}$ .<sup>43</sup> In einer anderen Studie bei Patienten mit septischem Schock hatten 21% eine Kerntemperatur  $<35,6^{\circ}\text{C}$ .<sup>115</sup> Es ist nicht bekannt, warum der Organismus in manchen Fällen mit Fieber reagiert und in anderen mit Hypothermie.<sup>115</sup> Beide Studien stimmen in der Beobachtung überein, dass die Mortalitätsrate bei Patienten mit spontaner Hypothermie etwa doppelt so hoch ist wie bei febrilen Patienten. Clemmer et al. berichteten außerdem über eine signifikante Vermehrung von ZNS-Dysfunktionen, eine Steigerung von Serum-Bilirubin-Konzentrationen und eine verminderte Wahrscheinlichkeit sich vom Schock zu erholen, wenn eine Hypothermie vorlag.<sup>43</sup>

Diese ganz offensichtlich negativen Auswirkungen von spontaner Hypothermie bei Sepsis lassen sich aufgrund ihrer physiologischen Unterschiede nicht ohne weiteres auf die akzidentelle bzw. induzierte Hypothermie übertragen und müssen deshalb klar unterschieden werden.<sup>74</sup> Gilston vermutet bei der spontanen Hypothermie bei Sepsis das Vorliegen eines inadäquaten Metabolismus, während die induzierte Hypothermie eine mögliche therapeutische Intervention bei exzessivem Metabolismus darstelle.<sup>74</sup>

Zusammenfassend kommt man zu dem Ergebnis, dass die induzierte bzw. akzidentelle perioperative Hypothermie einige nachgewiesene positive wie negative Auswirkungen auf den Organismus hat. Der Effekt auf das Immunsystem wird allerdings sehr kontrovers diskutiert. Ob Hypothermie eine mögliche unterstützende Therapie der Sepsis darstellt, oder ob sie möglicherweise das Gegenteil bewirkt und als Risikofaktor anzusehen ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher zu entscheiden. Hierzu soll die vorliegende Dissertation einen Beitrag leisten.

## 1.6 Unterernährung als Risikofaktor?

Unterernährung ist ein weit verbreitetes medizinisches Problem. Nicht nur in den Entwicklungsländern muss sich der Arzt mit untergewichtigen bzw. fehlernährten Patienten befassen; tatsächlich ist die Prävalenz von Unterernährung in den westlichen Industrienationen wesentlich größer als man annehmen würde. Dies ist seit der Publikation „The skeleton in the hospital closet“ von Butterworth aus dem Jahre 1974 bekannt.<sup>38</sup> Es wurde mehrfach berichtet, dass 20 bis 60% aller Krankenhauspatienten leicht bis schwer unterernährt sind.<sup>55;56;203</sup> Insbesondere betroffen sind ältere Menschen. Hier wird eine generelle Prävalenz von 4% angenommen, bei hospitalisierten Menschen höheren Lebensalters sogar über 50%.<sup>47</sup> Weiterhin stärker gefährdet sind Patienten die an chronischen Krankheiten leiden und an Krankheiten des Nervensystems.<sup>203</sup> Ganz besonders häufig erleiden Tumorkachexie Patienten einen erheblichen Verlust von Körpergewicht. Offenbar ist allerdings diese Tumorkachexie nicht nur auf verminderte Nahrungsaufnahme zurückzuführen, sondern scheint weitere, nicht abschließend erforschte, tumorbedingte Faktoren zu involvieren.<sup>57</sup>

Viele Studien haben gezeigt, dass Unterernährung einen unabhängigen Risikofaktor für Morbidität und Mortalität darstellt. In einer Metaanalyse schlossen Pelletier et al. auf eine exponentiell ansteigende Mortalität, je geringer das Gewicht für ein entsprechendes Alter bei Kindern war.<sup>137;144</sup> Auch für alte Menschen wurde eine starke Assoziation von Mortalität und Unterernährung nachgewiesen.<sup>126;143;177</sup> Weiterhin bewirkt Unterernährung bei Alten eine Verschlechterung des mentalen Status und der pulmonalen Funktion.<sup>133</sup> Nicht zu vernachlässigen sind die Tatsachen, dass Unterernährung die Lebensqualität Betroffener deutlich einschränkt,<sup>48</sup> und unterernährte Patienten durchschnittlich länger im Krankenhaus verweilen.<sup>56</sup>

Unter diesen Bedingungen ist es bemerkenswert, dass viele Fälle von Unterernährung klinisch gar nicht erst diagnostiziert werden.<sup>122</sup> Anteil an diesem Missstand könnte die Tatsache haben, dass keine einheitlich akzeptierte Definition für Unterernährung bzw. die verschiedenen Grade selbiger existiert.<sup>125</sup> Auch gibt es keine Einigung darüber, wie ein unterernährter Patient identifiziert werden kann, noch darüber wie eine diagnostizierte Unterernährung behandelt werden soll.<sup>198</sup> Der Arzt muss die Diagnose

anhand klinischer Faktoren wie dem Körpergewicht, der Dicke einer Trizeps-Hautfalte oder dem Armmuskel-Umfang tätigen. Dies bedarf einiger Erfahrung. Hilfreich können Funktionstests wie die Handdynamometrie und Laborparameter wie das Serum-Albumin sein.<sup>133</sup> Gerade für den Serum-Albumin-Spiegel ist eine Assoziation mit dem Krankenhaus-Outcome gezeigt worden.<sup>89;178</sup> Weiterhin ist der „Body mass index“ ein hilfreicher Parameter in der Diagnose von Über- bzw. Untergewicht in der klinischen Praxis.<sup>9;98;141</sup> Er wird berechnet indem man das Körpergewicht in kg durch das Quadrat der Körperlänge in cm teilt. Es wurde gezeigt, dass der BMI das gesamte Fettgewebe des Körpers mit einem Fehler von nur 10% oder weniger schätzt. Der Vorteil des BMI, insbesondere im Vergleich zum „idealen Körpergewicht“, liegt in der Unabhängigkeit von der Körperlänge. Allerdings ist auch hier eine Unzuverlässigkeit zu beachten, bei Personen mit extremem Alter, Körpergröße und sehr muskulärem Körperbau. Die 1995 neu erarbeiteten Einteilungen für den BMI sind wie folgt definiert:<sup>9;98;141</sup>

- BMI < 18,5 = Untergewicht
- BMI 18,5 – 24,9 = Normal / Gesund
- BMI 25 – 29,9 = Übergewicht
- BMI  $\geq$  30 = Adipositas

Es war erst 1959, als man Unterernährung mit Infektionen in Zusammenhang brachte. Erst nachdem Nevin Scrimshaw in einer bedeutenden Arbeit auf die Interaktionen zwischen Unterernährung und Infektionen hinwies,<sup>169</sup> wurde dieser wichtigen Beziehung Aufmerksamkeit von Klinikern und Forschern zuteil.<sup>99</sup> Scrimshaw et al. tätigten die Aussage, dass Unterernährung die Anfälligkeit für infektiöse Krankheiten erhöhe und infektiöse Krankheiten wiederum den Ernährungszustand verschlechtern. Dies resultiere in einem Teufelskreis der letzten Endes zum klinischen Bild des Kwashiorkor und zum Tod führe.<sup>99</sup>

Erst viele Jahre später wusste man genug über das menschliche Immunsystem, um die negativen Auswirkungen der Unterernährung auf selbiges ausreichend zu erklären.<sup>168</sup> Heute weiß man, dass Unterernährung die Immunität des Organismus auf unterschiedliche Arten ungünstig beeinflusst, sowohl auf humoraler, als auch auf zellulärer Ebene. So schränkt Malnutrition die Funktion des Thymus ein und führt

damit zu einer gestörten Reifung von T-Lymphozyten. Die resultierende erniedrigte Zahl an funktionstüchtigen T-Helferzellen, führt zu einer verminderten Zahl an Antikörper produzierenden Zellen.<sup>99</sup> Außerdem ist die Affinität der produzierten Antikörper vermindert. Dies führt zu einer verschlechterten Reaktion auf präsente Antigene.<sup>40</sup> Weiterhin ist bei Unterernährung die Konzentration und Aktivität der meisten Komplement-Faktoren vermindert. Da diese als essentielle Opsonine fungieren, wird durch ihren Mangel die Phagozytose durch Leukozyten vermindert; dies wirkt sich insbesondere in der Initialphase einer Infektion mit gram-negativen Bakterien negativ aus.<sup>99</sup> Zusätzlich werden durch Unterernährung das sauerstoffabhängige sowie das sauerstoffunabhängige (Laktoferrin, Lysozym, Hydrolase, Protease) antimikrobielle System der neutrophilen Granulozyten erheblich in ihrer Funktion beeinträchtigt.<sup>168</sup>

Ein weiterer Weg, auf dem Unterernährung das Immunsystem alteriert, ist die behinderte Produktion von Zytokinen. So wurde über eine verminderte Expression von IL-1, IL-2, IL-6, Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  berichtet.<sup>28;40;121</sup> Außerdem ist die Reaktion von T-Lymphozyten auf Zytokinstimulation beeinträchtigt.<sup>198</sup>

Etliche klinische Studien belegen die negativen Einflüsse der Unterernährung auf das Immunsystem. An dieser Stelle sei nur auf zwei neue Publikationen aus dem Jahre 2004 hingewiesen. In einer Studie an afrikanischen Kindern, wurde gezeigt, dass Unterernährung eines von fünf Indizes war, das signifikant mit dem Vorliegen von Infektionen der Blutbahn assoziiert war.<sup>137</sup> Eine andere Studie belegte, dass bei kritisch Kranken eine Kalorienzufuhr von weniger als 25% der empfohlenen Menge, zu einer gesteigerten Rate an Infektionen der Blutbahn führt.<sup>159</sup>

Chandra kommt zu dem Schluss, dass Unterernährung die weltweit häufigste Ursache für Immundefizienz darstellt.<sup>41</sup>

Insbesondere aufgrund der nachweislich negativen Effekte auf das Immunsystem, ist die Unterernährung regelmäßig in der Diskussion um seine Bedeutung als Risikofaktor für das perioperative Outcome. Dies ist auch deshalb eine Frage von großer Bedeutung, da berichtet wurde, dass bis zu 30% aller Patienten, die sich gastrointestinalen Operationen unterziehen müssen, unterernährt sind.<sup>90</sup> Gallagher-

Allred et al. kommen in einem Review zu dem Ergebnis, dass unterernährte Patienten zwei- bis dreifach häufiger perioperative Komplikationen erleiden, sowie eine höhere Mortalität aufweisen, als gut ernährte vergleichbare Patienten.<sup>72</sup> Den Autoren zufolge kann Unterernährung den Krankenhausaufenthalt um bis zu 90% verlängern. Windsor wiederum erkennt in seinem Review zum Thema des chirurgischen Risikos unterernährter Patienten Unterernährung durchaus als Risikofaktor an.<sup>198</sup> Er merkt aber an, dass dieses Risiko möglicherweise so gering sei, dass es neben weitaus wichtigeren Faktoren für das Operationsoutcome, wie zum Beispiel den Fähigkeiten des Chirurgen und Anwendung geeigneter Antibiotika, nicht sehr schwer wiegen würde. Gleiches wird in einer aktuellen orthopädischen Studie zu postoperativen Wundinfektionen und Unterernährung geschlussfolgert<sup>151</sup> Windsor führt weiterhin an, dass es wegen der häufig zusätzlich vorliegenden Risikofaktoren Schwierigkeiten bereite, klar zu differenzieren, ob Unterernährung tatsächlich ein schwerwiegender eigenständiger Risikofaktor ist, oder ob es sich lediglich um eine häufige Assoziation handelt.<sup>198</sup>

Ein klarer Risikofaktor allerdings scheint Unterernährung zu sein, wenn sie gepaart mit offensichtlich gestörten Organfunktionen einhergeht. In diesem Fall sind signifikant gehäuft postoperative Sepsis und Pneumonien beobachtet worden.<sup>199</sup>

Eine andere Studie wiederum identifizierte einen Gewichtsverlust von nur 10%, wie auch einen erniedrigten Albuminspiegel, als unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung von schweren postoperativen septischen Komplikationen.<sup>82</sup> In einer Publikation aus dem Jahre 2005 berichteten Miki et al, dass unterernährte ältere Tumorpatienten schwerwiegendere postoperative inflammatorische Komplikationen erlitten als gut ernährte alte Patienten. Dies ging einher mit einer reduzierten Expression von IL-1 Rezeptor Antagonisten in der unterernährten Gruppe.<sup>126</sup>

Zusammenfassend kommt man zu dem Ergebnis, dass Unterernährung ein weit verbreiteter pathologischer Zustand ist, der mit erheblichen negativen Folgen für den Patienten verbunden sein kann. Sie ist ein eindeutig identifizierter Risikofaktor für Morbidität und Mortalität. Die Bedeutung als Risikofaktor für die perioperative Phase und insbesondere für das Outcome bei postoperativer Sepsis, ist nicht eindeutig geklärt. Dazu soll die vorliegende Dissertation einen Beitrag leisten.

## 1.7 CMRTs (Klinik modellierende randomisierte Studien)

Es wurde schon anfangs erwähnt, dass es in den letzten Jahren viele Enttäuschungen auf dem Gebiet der Sepsisforschung gegeben hat. Viele Therapieansätze, die in Tierversuchen viel versprechende Resultate zeigten, versagten in anschließenden klinischen Studien.<sup>88;204</sup>

Die Gründe für diese frustrierenden Ergebnisse sind sicherlich vielfältig. So ist unter anderem die Physiologie von Versuchstier und Mensch natürlich nicht völlig gleich.<sup>60</sup> Als weiterer, wichtiger Grund für das Versagen der Forschungsansätze, ist die nicht ausreichend kliniknahe Durchführung der Tierversuche zu diskutieren.<sup>17;20;60</sup> So wurden viele Versuche an Tieren mit sehr niedriger Komplexität durchgeführt. Diesen Versuchen gelingt es nicht, die klinische Situation, der der Patient ausgesetzt ist, in ihrer Gesamtheit ausreichend nachzubilden. Beispielsweise seien die Anwendung von Antibiotika, Schmerzmittel und Anästhetika genannt, deren Interaktion mit der zu evaluierenden Substanz möglicherweise durchaus Änderungen in deren Wirkung verursachen können.

Oberstes Ziel, um Tierstudien so vergleichbar wie möglich zu machen, muss es daher sein, das Studiendesign so nah wie möglich an die klinische Realität heranzuführen. Dies schließt die Studienplanung, das Studiendesign und die Durchführung ein. Dabei muss eine Durchführbarkeit der Versuche weiterhin gewährleistet bleiben.

Lorenz et al. entwickelten in Anbetracht dieser Forderungen ein Sepsisprophylaxe-Modell der experimentellen, fäkalen Peritonitis bei der Ratte.<sup>110</sup> Dieses Modell bezieht eine Vielzahl von klinischen Faktoren in die Versuche an der Ratte mit ein und wurde deshalb CMRT („Clinic modeling randomized trials“) genannt.<sup>17;19</sup> Unter Berücksichtigung der standardisierten Kriterien für randomisierte klinische Studien anhand des CONSORT Statements,<sup>130</sup> werden unter anderem Fallzahlberechnungen anhand der Formel von Friedman et al. durchgeführt.<sup>71</sup> Dabei wird z.B. ein klinisch relevanter Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen von 30% zugrunde gelegt. Dies bedeutet, dass eine Überlebensverbesserung von 50 auf 80% angestrebt wird ( $d=0,3$ ) und nicht etwa ein Sprung von 0 auf 100%. Es wird weiterhin entsprechend des „Intention-to-treat“ Vorsatzes vorgegangen, eine Randomisierung und Verblindung durchgeführt und eine adäquate statistische Evaluierung angeschlossen. Zusätzlich werden die Tiere anästhetisiert und erhalten

Volumensubstitution und Antibiotika in klinisch relevanter Dosierung. Sie werden einer Operation unterzogen, bei der humane Stuhlkeime in das kleine Becken inokuliert werden und erhalten eine adäquate Analgesie.<sup>20</sup>

CMRTs sind aufgrund dieser klinischen Nähe eine sehr gute Möglichkeit, neue Therapieansätze zu evaluieren. Auch können potentielle Risikofaktoren auf ihre Bedeutung für das Sepsis-Outcome im klinik-simulierten Umfeld erforscht werden. Insbesondere für die Evaluation von Risikofaktoren scheint es wichtig, möglichst viele klinische Faktoren und deren Interaktion in die Studie mit einzubeziehen, denn nicht jeder potentielle Risikofaktor trägt auch im komplexen klinischen Umfeld noch große Bedeutung.<sup>198</sup>

Deshalb wurde das CMRT-Modell gewählt, um die Fragestellungen der vorliegenden Dissertation zu explorieren.

## **1.8 Fragestellung der Arbeit**

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Auswirkung von Risikofaktoren auf das Überleben und die Immunabwehr (Zytokinspiegel, Phagozytoseaktivität und Blutbild) in der postoperativen Sepsis. Es soll in Rattenstudien, die dem Konzept der Klinik modellierenden, randomisierten Tierstudien (CMRT) folgen, die Bedeutung von perioperativer Hypothermie und präoperativer Unterernährung als Risikofaktoren für das Outcome bei postoperativer abdomineller Sepsis evaluiert werden. Weiterhin soll überprüft werden, inwieweit G-CSF (Granulozyten-Colonie-Stimulierender-Faktor) das Überleben bei Vorliegen von Hypothermie verbessern kann.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 230-280g für die Hypothermie-Versuche und 150-200g für die Unterernährungs-Versuche verwendet. Auf die Verwendung von weiblichen Versuchstieren wurde bewusst verzichtet, aufgrund möglicher Abweichungen bedingt durch den weiblichen Zyklus. Das Alter betrug durchschnittlich sechs Wochen. Die Versuchstiere wurden unter kontrollierten Standardbedingungen bei 27°C Raumtemperatur und 55% Luftfeuchtigkeit, jeweils zu viert (bei den Versuchen zur Unterernährung jeweils einzeln) in Macrolon-Käfigen Typ 3, bei künstlichem Tag / Nachtrhythmus (Licht von 7:00-19:00 Uhr, 100 Lux) gehalten. Beginnend vier Tage vor bis zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere mit der Standarddiät Altromin 1313, Altromin, Lage, Deutschland und Wasser ad libitum versorgt.

Den internationalen Richtlinien für den Umgang mit Versuchstieren wurde durchweg Folge geleistet.<sup>154</sup>

Die Versuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission beim Regierungspräsidium in Gießen genehmigt (Az: II 25.3-19 c 20-15 (1) 55/00 – 20/19 – 1/00).

### 2.2 Reagenzien, Materialien

- **Stuhlaufarbeitung**

Für die Bereitung der Stuhlsuspension wurden Thioglykolat, Bariumsulfat, Glycerin (mindestens 87%) und Katalase (2000-5000 U/mg) verwendet.

- **Versuchsablauf am Tier**

Für die Narkose bei den Versuchstieren wurde Fentanyl (Janssen, Neuss) und Droperidol (Dihydrobenzperidol, Janssen, Neuss) verwendet. Als Antibiose diente die Kombination Cefuroxim / Metronidazol (Smith Kline Beecham, München).

Zur postoperativen Analgesie wurde Tramadol (Mundipharma, Limburg) eingesetzt. Weiterhin wurden Ringer-Lösung (Braun, Melsungen), G-CSF (Filgrastim, Amgen Inc., München) und Glukose 5 (Braun, Melsungen) verwendet. Als Nahtmaterial kam Vicryl 3-0 (Ethicon, Norderstedt) zum Einsatz.

- **Biochemische / Immunologische Untersuchungen**

Zur Antikoagulation der Blutproben wurde Heparin (Liquemin, Roche, Basel, Schweiz) und EDTA (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Die Messung der Zytokine IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und MIP-2 wurde mit entsprechenden Ratten-ELISA-Kits der Firma Biosource International (Camarillo, CA, USA) durchgeführt. Von der Firma Orpegen-Pharma (Heidelberg) wurden Phagozytose-Kits zur Phagozytosemessung bezogen. Weiterhin stand ein Flowzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), ein automatischer Zellzähler (Coulter Max-M, Krefeld) und eine Eppendorf-Zentrifuge (10000G, Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung.

### 2.3 Aufarbeitung der Stuhlsuspension

Es wurden Stuhlproben von drei gesunden männlichen Spendern im Verhältnis 1:1 mit einer Thioglykolat-Boullion (14,5g Thioglykolat, 50g Bariumsulfat und 500ml H<sub>2</sub>O, über Nacht mit N<sub>2</sub> begast) und anschließend mit 10%igem Glycerin gemischt. Dieser Stuhlsuspension wurden 0,19mg Katalase pro 100ml zugegeben, welche aus boviner Leber aufgereinigt wurde. Anschließend wurde diese Lösung homogen gemischt und unter anaeroben Bedingungen in einer anaeroben Werkbank durch chirurgische Gaze gefiltert. Die nun fertige Suspension wurde in Einzeldosen zu 10, 5 und 2ml in Probenröhrchen bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise war eine gleich bleibende Qualität der Stuhlsuspension für mindestens sechs Monate gewährleistet, so dass alle Versuchstiere aller Versuchsreihen Stuhl der gleichen Qualität erhielten.<sup>110</sup>

## 2.4 Versuchsablauf am einzelnen Tier

### 2.4.1 Versuchsdesign

In der ersten Versuchsreihe wurde eine Stuhl-Dosis-Wirkungskurve erstellt. In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss des Faktors Hypothermie (32°C) auf den septischen Verlauf in der Ratte überprüft. In der dritten Versuchsreihe wurde die Auswirkung von chronischer Unterernährung evaluiert.

#### 2.4.1.1 Stuhl-Dosis-Wirkungskurve

Es wurde die Mortalität bei verschiedenen intraperitoneal inokulierten Volumina einer 1:2,5 verdünnten Stuhlsuspension untersucht. Vier Gruppen wurden hierzu gebildet:

- Gruppe A: Stuhldosis 1,4ml/kg Körpergewicht
- Gruppe B: Stuhldosis 1,8ml/kg Körpergewicht
- Gruppe C: Stuhldosis 2,2ml/kg Körpergewicht
- Gruppe D: Stuhldosis 2,6ml/kg Körpergewicht

Die Gruppengröße betrug 10 Tiere pro Gruppe. Alle Tiere erhielten eine Antibiotikaprophylaxe (siehe unten).

#### 2.4.1.2 Versuchsreihe zur Hypothermie

Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Der Versuch 1 bestand aus sechs Blöcken, Versuch 2 aus einem und Versuch 3 aus vier Blöcken, die an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt wurden. An jedem Versuchstag wurden Tiere aus allen Gruppen behandelt, jeweils mit einem Viertel bzw. Sechstel der gesamten Gruppengröße.

**Versuch 1:** Der Einfluss von präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate, Zytokinausschüttung und Differentialblutbild

Versuch 1 wurde im Design einer Gruppen-Sequenz Studie durchgeführt.<sup>112</sup> Zuerst wurden folgende drei randomisierte Gruppen gebildet:

- Gruppe A: Die Tiere dieser Gruppe wurden präoperativ (eine Stunde vor Laparotomie) auf 32°C gekühlt und erhielten eine intraperitoneale Applikation der Stuhlsuspension.  
**(präoperative Kühlung + Infektion)**
- Gruppe B: Die Tiere dieser Gruppe wurden genau wie in die in Gruppe A gekühlt, bekamen aber kein Stuhlinokulum, es wurde also keine Infektion durchgeführt.  
**(präoperative Kühlung ohne Infektion)**
- Gruppe C: Die Tiere dieser Gruppe wurden nicht gekühlt, waren also über den ganzen Versuch hinweg normotherm (38°C). Wie in Gruppe A wurde auch hier eine Infektion mit Stuhlinokulum durchgeführt.  
**(Normothermie + Infektion)**

Alle Tiere erhielten eine Antibiotikaprophylaxe (siehe unten).

Jede Gruppe bestand initial aus 12 Versuchstieren ( $n = 12$ ). Die Gruppengrößen wurden anhand der Formel von Friedman et al.<sup>71</sup> ermittelt mit einem geschätzten Überlebensunterschied von 30% zwischen den Gruppen A und C ( $\alpha$ -Fehler = 0,025;  $1-\beta = 0,8$ ).

Nach diesem Versuch wurde eine Zwischenanalyse durchgeführt. Basierend auf dem tatsächlich beobachteten Überlebensunterschied zwischen den Gruppen A und C (25%) wurde eine erneute Fallzahlberechnung durchgeführt,<sup>71</sup> welche eine Gruppengröße von 42 ergab. Dies zugrunde legend, wurde der Versuch um jeweils weitere 30 Ratten in den Gruppen A und C ergänzt.

Es wurde bei jeweils der Hälfte der Versuchstiere jeder der anfänglichen Gruppen (Zuteilung randomisiert, jeweils 6 Ratten) eine Stunde vor und eine Stunde nach Laparotomie Blut abgenommen. Daraus wurden die Zytokine MIP-2 und IL-10 bestimmt. Zusätzlich wurde Blut von jeweils 10 Ratten der beiden Endgruppen

(Zuteilung randomisiert) asserviert. Hieraus wurden die Zytokine IL-6 und MIP-2 bestimmt, sowie ein Differentialblutbild erstellt.

**Versuch 2: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie auf das Überleben; niedrige Komplexizität (ohne Antibiotikaprophylaxe)**

Es wurden zwei randomisierte Gruppen gebildet:

- Gruppe A: Die Tiere dieser Gruppe wurden postoperativ (für eine Stunde unmittelbar nach der Laparotomie) auf 32°C gekühlt und erhielten eine intraperitoneale Applikation der Stuhlsuspension. Es wurden keine Antibiotika eingesetzt.

**(postoperative Hypothermie + Infektion ohne Antibiotika)**

- Gruppe B: Die Tiere dieser Gruppe wurden nicht gekühlt, behielten also während des gesamten Versuches Normothermie (38°C). Auch in Gruppe B erfolgte eine abdominelle Kontamination und Infektion und es wurden ebenfalls keine Antibiotika verabreicht.

**(Normothermie + Infektion ohne Antibiotika)**

Jede Gruppe umfasste 10 Versuchstiere (n = 10).

**Versuch 3: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlich appliziertem G-CSF auf das Überleben, Differentialblutbild, Zytokinausschüttung und Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten; höhere Komplexizität (mit Antibiotikaprophylaxe)**

Es wurden drei randomisierte Gruppen gebildet:

- Gruppe A: Die Tiere dieser Gruppe wurden postoperativ (für eine Stunde unmittelbar nach der Laparotomie) auf 32°C gekühlt und erhielten eine intraperitoneale Applikation der Stuhlsuspension.

**(postoperative Hypothermie + Infektion)**

- Gruppe B: Die Tiere dieser Gruppe wurden wie die der Gruppe A postoperativ gekühlt, erhielten aber zusätzlich eine G-CSF Prophylaxe. Wie in Gruppe A erfolgte auch hier eine abdominelle Kontamination und Infektion.

**(postoperative Hypothermie + G-CSF + Infektion)**

- Gruppe C: Die Tiere dieser Gruppe wurden nicht gekühlt, behielten also während des gesamten Versuches Normothermie (38°C). Auch in Gruppe C erfolgte eine abdominelle Kontamination und Infektion.

**(Normothermie + Infektion)**

Jede Gruppe umfasste 20 Versuchstiere (n = 20). Die Berechnung erfolgte wie oben beschrieben nach der Formel von Friedman et al.<sup>71</sup>

Alle Versuchstiere erhielten eine Antibiotikaprophylaxe (siehe unten).

Allen Versuchstieren wurde jeweils eine Stunde vor und nach abdomineller Kontamination und Infektion Blut abgenommen und daraus ein Differentialblutbild erstellt sowie die Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 gemessen und die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten getestet.

#### **2.4.1.3 Versuchsreihe zur Unterernährung**

Es wurden drei Versuche durchgeführt. Die Versuche 2 und 3 bestanden aus je zwei Blöcken, die an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt wurden. An jedem Versuchstag wurden alle Gruppen mit jeweils der Hälfte der gesamten Gruppengröße geführt.

##### **Versuch 1: Vorversuch zur Erprobung der Entwicklung chronischer Unterernährung**

Bevor mit einem großen Versuch zur Evaluation der chronischen Unterernährung begonnen werden konnte, musste zunächst ein kleiner, orientierender Vorversuch mit wenigen Tieren durchgeführt werden. Hierbei sollte die Methodik zur Entwicklung der chronischen Unterernährung in einem Zeitraum von drei Wochen und zur Abschätzung der Größe des Effektes der Unterernährung auf das septische Outcome überprüft werden.

Gewählt wurde eine Gruppengröße von fünf Versuchstieren pro Gruppe.

- Gruppe A: Die Tiere dieser Gruppe waren normal und altersentsprechend genährt. Es wurde an ihnen eine abdominelle Kontamination und Infektion durchgeführt.

**(Normal ernährt)**

- Gruppe B: Die Tiere dieser Gruppe wurden in den drei Wochen vor Laparotomie auf 50% Futter eingeschränkt und somit chronisch unterernährt. Auch hier wurde eine abdominelle Kontamination und Infektion durchgeführt.

**(Unterernährt)**

Bei allen Tieren wurde eine Antibiotikaphylaxe durchgeführt. Die Tiere beider Gruppen entstammten einer Lieferung, das heißt sie waren gleich alt, aber durch die Unterernährung in Gruppe B entstand ein Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen.

### Versuch 2: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensraten und Zytokinfreisetzung -gleiches Alter der Tiere beider Gruppen bei ACI-

Basierend auf den Ergebnissen von Versuch 1 wurde ein weiterer Versuch mit größerer Fallzahl durchgeführt. Die Formel nach Friedman et al.<sup>71</sup> ergab eine Gruppengröße von 30 Tieren ( $n = 30$ ). Die Gruppeneinteilung erfolgte analog zu Versuch 1:

- Gruppe A: Normal ernährt
- Gruppe B: Unterernährt

Bei allen Tieren wurde eine Antibiotikaphylaxe durchgeführt.

Wie schon in Versuch 1 stammten alle Ratten dieses Versuches aus einer Lieferung und waren somit gleich alt und durch die Unterernährung in Gruppe B im Gewicht differierend.

Sieben Versuchstieren pro Gruppe (Zuteilung zufällig) wurde nach Laparotomie Blut abgenommen. Daraus wurden die Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 bestimmt.

**Versuch 3: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung -gleiches Gewicht der Tiere beider Gruppen bei ACI-**

Dieser dritte Versuch wurde analog Versuch 2 durchgeführt mit der Änderung, dass die Tiere beider Gruppen nun nicht mehr gleich alt, sondern annähernd gewichtsgleich waren. Dies wurde erzielt indem die Ratten der Gruppe A erst nach der dreiwöchigen Unterernährungsphase von Gruppe B geliefert wurden, mit einem Gewicht vergleichbar dem der unterernährten Tiere.

Als Gruppengröße wurde in diesem Fall  $n = 20$  zugrunde gelegt.

- Gruppe A: Normal ernährt
- Gruppe B: Unterernährt

Bei allen Tieren wurde eine Antibiotikaprophylaxe durchgeführt.

Auch in Versuch 3 wurde sieben Versuchstieren pro Gruppe (Zuteilung randomisiert) eine Stunde nach Laparotomie Blut abgenommen. Daraus wurden die Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 bestimmt.

#### **2.4.2 Allgemeiner Versuchsaufbau und operative Durchführung**

Alle für den jeweiligen Versuchstag benötigten Ratten wurden vier Tage vor dem Operationstag geliefert. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Versuchstieren die Nahrung entzogen; Wasser war weiterhin ad libitum verfügbar. Zum gleichen Zeitpunkt wurde jede einzelne Ratte mit einer Ohrmarke versehen und gewogen. Anhand der zufällig zugeteilten Nummern auf der Ohrmarke wurde die Randomisierung durchgeführt und die Tiere auf die entsprechenden Versuchsgruppen aufgeteilt. 20 Versuchstieren im dritten Versuch der Hypothermierihe (siehe 2.4.1) wurde ebenfalls zwölf Stunden vor der Operation  $20\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht G-CSF subkutan injiziert. Das G-CSF wurde im Verhältnis 1:15 mit Glukose 5% verdünnt. Den Tieren, die keine G-CSF Injektion bekamen, wurde als Placebo gleiches



Volumen reiner Ringer-Lösung subkutan injiziert. Die G-CSF- bzw. Placebogabe in den entsprechenden Versuchen wurde 12 und 36 Stunden nach der Operation wiederholt.

Am Versuchstag selbst wurden alle Ratten abermals gewogen, um die, durch die Nahrungskarenz verursachten Gewichtsänderungen über Nacht erfassen und entsprechende Anpassungen in den zu applizierenden Volumina (Narkose, Antibiose, Stuhl-Inokulum) durchführen zu können.

Durch intraperitoneale Injektion von einem 1:1 Gemisch aus Fentanyl und Droperidol (0,2 und 10mg/kg Körpergewicht) wurde die Narkose eingeleitet. Anschließend wurde eine Schwanzvenenkanülierung durchgeführt, über welche zur Volumensubstitution 2ml Ringer-Lösung intravenös appliziert wurden. Dies ist vergleichbar mit der Volumensubstitution beim Menschen.

Zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  (eine Stunde vor der Laparotomie zur Applikation des Stuhl-Inokulums) und  $t = +1h$  erfolgten intravenöse Gaben der Antibiotika Cefuroxim und Metronidazol in einer klinisch gebräuchlichen Dosierung (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Diese Antibiotikagabe erfolgte nicht im Hypothermie-Versuch 3 (2.4.1.2).

Eine Stunde nach Antibiotikaphylaxe ( $t = 0h$ ) wurde zur Durchführung einer abdominalen Kontamination und Infektion eine Laparotomie vorgenommen. Das Vorgehen wurde der klinischen Situation bei einem chirurgischen Eingriff nachempfunden. Über eine mittige, etwa 2cm lange Inzision wurde die Peritonealhöhle eröffnet und ein definiertes Volumen der 1:2,5 mit Ringer-Lösung verdünnten Stuhlsuspension intraperitoneal in das kleine Becken verabreicht. Für die Bestimmung des zu verabreichenden Volumens der Stuhlsuspension, diente die unter 2.4.1.1 beschriebene Stuhl-Dosis-Wirkungskurve. Das Volumen, das in der Stuhl-Dosis-Wirkungskurve eine Mortalität von etwa 40% bewirkte, wurde für alle weiteren Versuche außer Versuch 2 der Hypothermie (siehe 2.4.1.2) zugrunde gelegt. Da in Versuch 2 keine Antibiotikaphylaxe erfolgte, wurde nur 50% des definierten Stuhlvolumens verwendet.

Anschließend wurde schichtweise das Peritoneum und die Haut mit chirurgischer Nahttechnik verschlossen. Dabei kam resorbierbares Vicryl 3-0 Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zum Einsatz.

Zur postoperativen Analgesie wurde zum Zeitpunkt  $t = +1h$  eine subkutane Injektion von 20mg/kg Körpergewicht Tramadol vorgenommen. Um die Schmerzfreiheit der Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum aufrechtzuerhalten wurde die Tramadolinjektion in 24 Stunden Abständen wiederholt.

Zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  und  $t = +1h$  wurde einzelnen Ratten mittels einer heparinisierten Glaskapillare Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus abgenommen. Abgenommen wurde jeweils 1ml Blut das mit 100 $\mu$ l EDTA und 0,2ml Blut das mit 100 I.E. Heparin versetzt wurde. Das verlorene Blutvolumen wurde durch 2,4ml Ringer-Lösung ersetzt.

Nach erfolgter Antibiotika- und Analgetikainjektion eine Stunde nach Laparotomie wurden die Tiere zurück in die Käfige gesetzt und mit Futter und Wasser ad libitum versorgt.

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 120 Stunden nach der Operation. Als primärer Endpunkt war die 120 Stunden Mortalität festgesetzt, als sekundäre Endpunkte die Zytokinlevel im Plasma, die Phagozytoseleistung der Granulozyten und das Differentialblutbild vor und nach Stuhlinokulum. Alle überlebenden Tiere wurden nach den 120 Stunden Beobachtung durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet.

#### **2.4.3 Zusätzliches Vorgehen bei den Versuchen zur Hypothermie**

Bei den Versuchen, die sich mit der Evaluation des Einflusses der Hypothermie auf den septischen Verlauf beschäftigten, war es erforderlich entweder präoperativ ( $t = -1h$ ) oder postoperativ ( $t = 0h$ ) (siehe 2.4.1) eine Hypothermie bei den Tieren der entsprechenden Gruppen einzustellen. Zielwert war eine Körperkerntemperatur von 32°C. Diese wurde im gesamten Verlauf der Kühlung mittels rektaler Thermometer kontrolliert. Es wurde eine Oberflächenkühlung mittels in Plastikbeutel eingeschweißten Eises durchgeführt. Die Körpertemperatur wurde dabei über eine Stunde konstant bei 32°C gehalten. Nach Abschluss der Kühlungsphase wurden die gekühlten Tiere unter einer Infrarotlampe über den Zeitraum von einer Stunde langsam bis zu normaler Körperkerntemperatur (38°C) erwärmt.

#### 2.4.4 Zusätzliches Vorgehen bei den Versuchen zur Unterernährung

Bei den Versuchen, die sich mit der Evaluation des Einflusses der chronischen Unterernährung auf den septischen Verlauf beschäftigten, war bei der Hälfte der Ratten präoperativ eine leichte chronische Unterernährung erforderlich. Orientierend an der Methodik von Glass et al.<sup>78</sup> und Picarel-Blanchot et al.<sup>145</sup> wurde ein Nahrungsentzug von 50% gewählt, bei normaler Laborkost in pulverisierter Form (CE-2, Clea Japan Inc., Japan). Der Nahrungsentzug wurde auf drei Wochen begrenzt. Die bestellten männlichen Wistar-Ratten hatten bei Laborlieferung ein Gewicht zwischen 165 und 175g. Ausgehend von den Studien<sup>78;145</sup> erwarteten wir eine Gewichtszunahme der normal ernährten Ratten im dreiwöchigen Beobachtungszeitraum auf etwa 300g, eine Zunahme der unterernährten Ratten auf etwa 200g. Somit war mit der Entwicklung einer Gewichts Differenz zwischen den beiden Gruppen von annähernd 100g zu rechnen.

In alle Käfige wurden Metallgitter eingelegt, um die Ratten daran zu hindern Einstreu und eigene Exkremate zu fressen und damit das Ergebnis zu beeinflussen. Am ersten Tag nach Laborankunft wurden alle Ratten zur Gewöhnung an die neue Futterkonsistenz mit dem oben erwähnten CE-2 Futter ad libitum versorgt. Eine pulverförmige Nahrung war nötig, da die geringen, den unterernährten Ratten zur Verfügung stehenden Mengen in gepresster Form nicht zuverlässig abgewogen werden konnten. Das CE-2 Futter wurde in speziellen umwerfsicheren Glasbehältnissen in den Käfigen bereitgestellt.

Nach der eintägigen Eingewöhnungsphase wurden die Ratten gewogen und die Gewichte auf einem Verlaufsprotokoll verzeichnet. Im Folgenden wurden die Ratten der normal ernährten Gruppe weiterhin mit Nahrung ad libitum versorgt, wobei jeweils morgens um 9:00Uhr eine definierte, ausreichend große Menge zur Verfügung gestellt und am nächsten Morgen erneut gewogen wurde. Die Differenz gab die verzehrte Futtermenge pro Ratte der normal ernährten Gruppe in 24h an. Aus den Werten für alle Ratten dieser Gruppe wurde ein Durchschnittswert errechnet. Dieser durchschnittliche 24h-Nahrungsverbrauch wurde für die Berechnung der Nahrungsmengen der unterernährten Gruppe zugrunde gelegt. Jeweils 50% dieser Menge wurde jeder einzelnen Ratte der unterernährten Gruppe am folgenden Tag, ebenfalls um 9:00 Uhr morgens, zur Verfügung gestellt. Somit stand den

unterernährten Ratten immer genau die Hälfte der von den normal ernährten Ratten verzehrten Nahrungsmenge zur Verfügung. Parallel zur Bestimmung der Nahrungsmengen wurden auch alle Ratten gewogen. Die Nahrungsmengenanpassung und Gewichtserhebung wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt. Auf diese Weise wurde über 21 Tage verfahren.

Im Weiteren wurde analog dem unter Punkt 2.4.2 geschilderten Ablauf vorgegangen.

## **2.5 Erstellung des Differentialblutbildes, Messung von Zytokinen und Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten**

Wie unter Punkt 2.4.2 geschildert, wurde randomisiert einigen Versuchstieren Blut abgenommen. 1ml Blut wurde in einem Eppendorf-Cup mit 100µl EDTA und 0,2ml Blut in einem zweiten Eppendorf-Cup mit 100 I.E. Heparin versetzt.

Ein Teil des heparinisierten Vollblutes wurde unmittelbar nach Blutabnahme dazu verwendet, mittels eines für Rattenblut geeichten Coulter-MaxM Blutzelldifferenzierungsautomaten (Coulter, Krefeld, Deutschland) ein Differentialblutbild zu erstellen.

Der zweite Teil wurde zur Messung der phagozytotischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verwendet. Hierzu wurde, ebenfalls kurz nach Entnahme, mit einem Phagotest-Kit der Firma Orpegen-Pharma die Phagozytose von Fluorescein-Isothiocyonat opsonierten E.Coli mit Hilfe eines Flowzytometers (FACScan) gemessen.

Das mit EDTA versetzte Vollblut wurde unmittelbar nach Entnahme zentrifugiert und das Plasma bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde mit entsprechenden Rat-ELISA-Kits der Firma Biosource die Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-6 und IL-10 gemessen.

## 2.6 Statistik

Die Fallzahlberechnungen für die Versuche wurden anhand der Formel von Friedman et al. durchgeführt.<sup>71</sup> Im Versuch mit präoperativer Hypothermie (siehe 2.4.1.2) wurde ein Gruppen-Sequenz Verfahren verwendet.<sup>112</sup>

Die Werte in den einzelnen Mortalitätsexperimenten sind als Raten angegeben. Für die statistische Bewertung der Überlebensraten wurde der Pearson Chi-Quadrat Test verwendet. Weiterhin diente die Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung der Überlebenskurven. Unterschiede zwischen den Kurven wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Für die Analyse der Zytokinwerte, Blutzellparameter und Phagozytose wurde ein nicht parametrischer Test verwendet. Hierzu wurde bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test und bei zwei Gruppen der Wilcoxon-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe der SPSS Software<sup>36</sup> durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

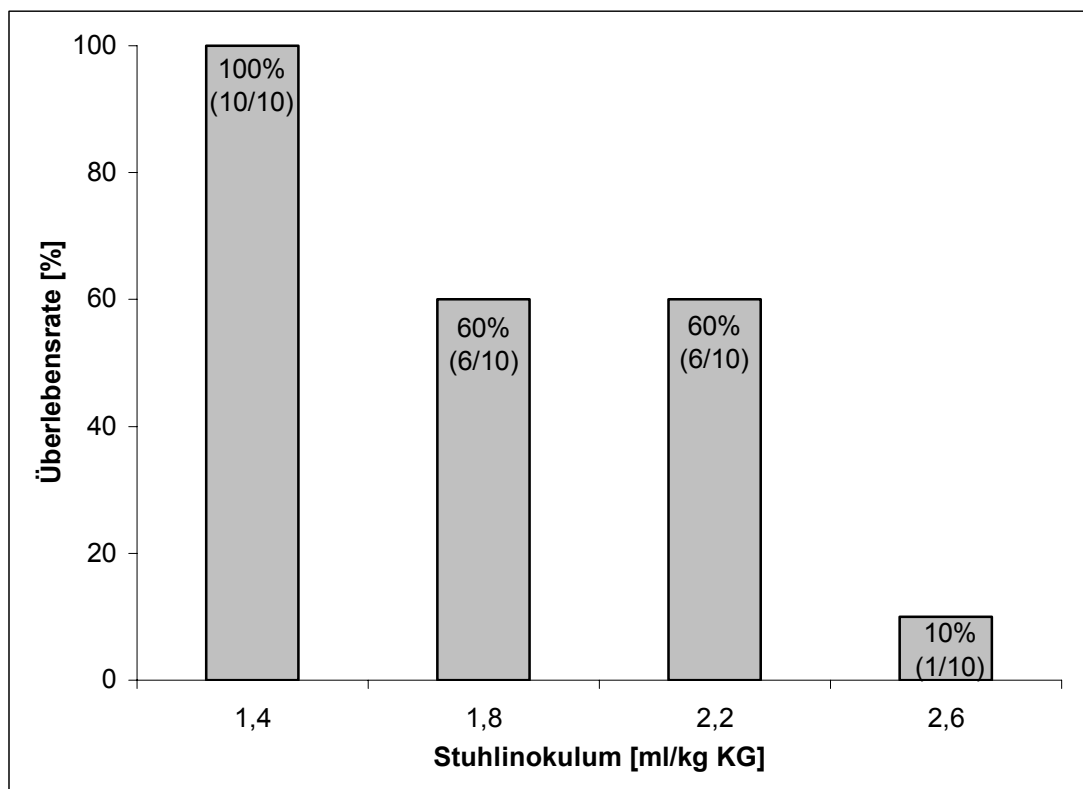
### 3.1 Stuhl-Dosis-Wirkungskurve

Unter Verwendung des unter Punkt 2.4.2 beschriebenen operativen Vorgehens, wurden die Überlebensraten unter Inokulierung aufsteigender Volumina der 1:2,5 mit Ringer-Lösung verdünnten Stuhlsuspension (1,4ml/kg; 1,8ml/kg, 2,2ml/kg, 2,6ml/kg Körpergewicht) ermittelt. Alle Tiere erhielten zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  und  $t = +1h$  eine intravenöse Antibiotikaphylaxe mit Cefuroxim und Metronidazol in einer klinisch gebräuchlichen Dosierung (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht).

Bei einem intraperitoneal inokulierten Stuhlsuspensionsvolumen von 1,4ml/kg Körpergewicht (KG) wurde eine Überlebensrate von 100%, bei einem Volumen von 1,8ml/kg KG eine Überlebensrate von 60% erzielt. Die Dosierung von 2,2ml/kg KG ergab eine Überlebensrate von ebenfalls 60%, während eine Applikation von 2,6ml/kg KG eine Überlebensrate von 10% zur Folge hatte (Abb. 3.1).

Dieses Ergebnis zeigt eine Abhängigkeit der 120-Stunden-Mortalität von der Dosierung der Stuhlsuspension. Auch die statistische Berechnung ergab einen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate zwischen den verschiedenen Gruppen mit  $p < 0,001$  im Chi-Quadrat-Test.

Im mittleren Mortalitätsbereich war keine genaue Differenzierung zwischen den Dosierungen 1,8ml/kg KG und 2,2ml/kg KG möglich. Es kann aber an diesem Ergebnis näherungsweise abgelesen werden, dass es für die gewünschte 30-50%ige Mortalität in den Kontrollgruppen der folgenden Versuche einer Stuhlinokulumdosierung zwischen 1,8ml/kg Kg und 2,2ml/kg KG bedarf. Es wurde eine Dosierung von 1,9ml/kg KG für alle kommenden Versuche zugrunde gelegt. Einzig für Versuch 2 in der Hypothermierreihe (siehe 2.4.1.2), wurde 50% dieser Dosis, 1ml/kg KG verwendet, da in diesem Versuch keine Antibiotikaphylaxe erfolgte.



**Abb. 3.1: Stuhl-Dosis-Wirkungskurve**

Es wurde in vier Gruppen (n = 10 Tiere pro Gruppe) der Einfluss von intraabdomineller Inokulation von 1,4; 1,8; 2,2 und 2,6ml/kg KG dosierter Stuhlsuspension auf die 120-Stunden-Überlebensrate untersucht. Antibiotikaprophylaxe erfolgte mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Chi-Quadrat-Test  $p < 0,001$ .

## 3.2 Versuchsreihe zur Hypothermie

### 3.2.1 Versuch 1: Der Einfluss von präoperativer Hypothermie auf das Überleben, Zytokinausschüttung und Differentialblutbild

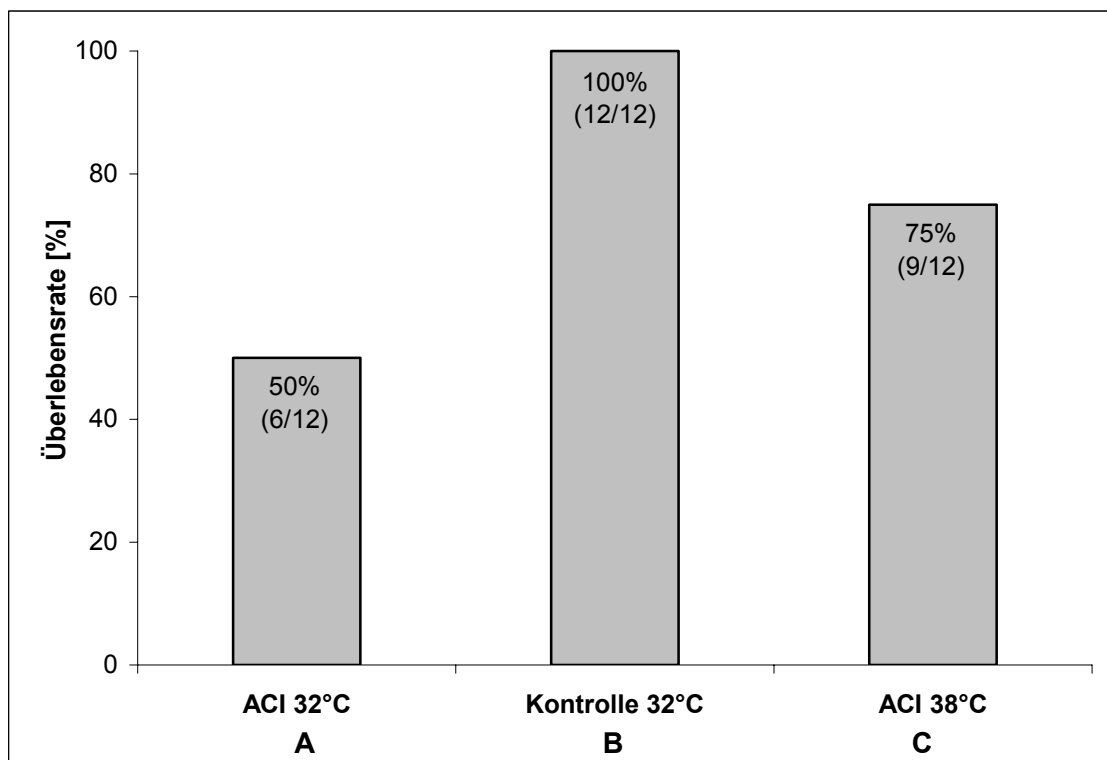
Im ersten Abschnitt dieses Versuches (vor Interimsanalyse), wurde einer Kontrollgruppe bestehend aus einer Stunde präoperativ auf 32°C gekühlten aber nicht infizierten Ratten (Gruppe B) eine Gruppe mit präoperativ gekühlten und infizierten Ratten (Gruppe A) und eine Gruppe mit durchweg normothermen und infizierten Ratten (Gruppe C) entgegengestellt. Alle Tiere erhielten zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  und  $t = +1h$  eine intravenöse Antibiotikaprophylaxe mit Cefuroxim und Metronidazol in einer Dosierung von 10 und 3,5 mg/kg Körpergewicht.

In der Hypothermie-Gruppe (Gruppe A) wurde eine Überlebensrate von 50% beobachtet, im Gegensatz zu einer Überlebensrate von 75% in der Normothermie-Gruppe (Gruppe C). Alle Versuchstiere der Kontrollgruppe ohne Infektion (Gruppe B) überlebten 120 Stunden (Abb. 3.2).

In der statistischen Prüfung mittels des Chi-Quadrat-Testes ergab sich über alle drei Gruppen eine Signifikanz mit  $p = 0,024$ .

Der Versuch zeigte eine Tendenz zur Verschlechterung des Überlebens bei präoperativ gekühlten Ratten mit Peritonitis gegenüber normothermen Ratten von 75 auf 50 Prozent. Dieser Unterschied war allerdings bei der gewählten Gruppengröße ( $n = 12$  Tiere pro Gruppe) statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,08$ ).



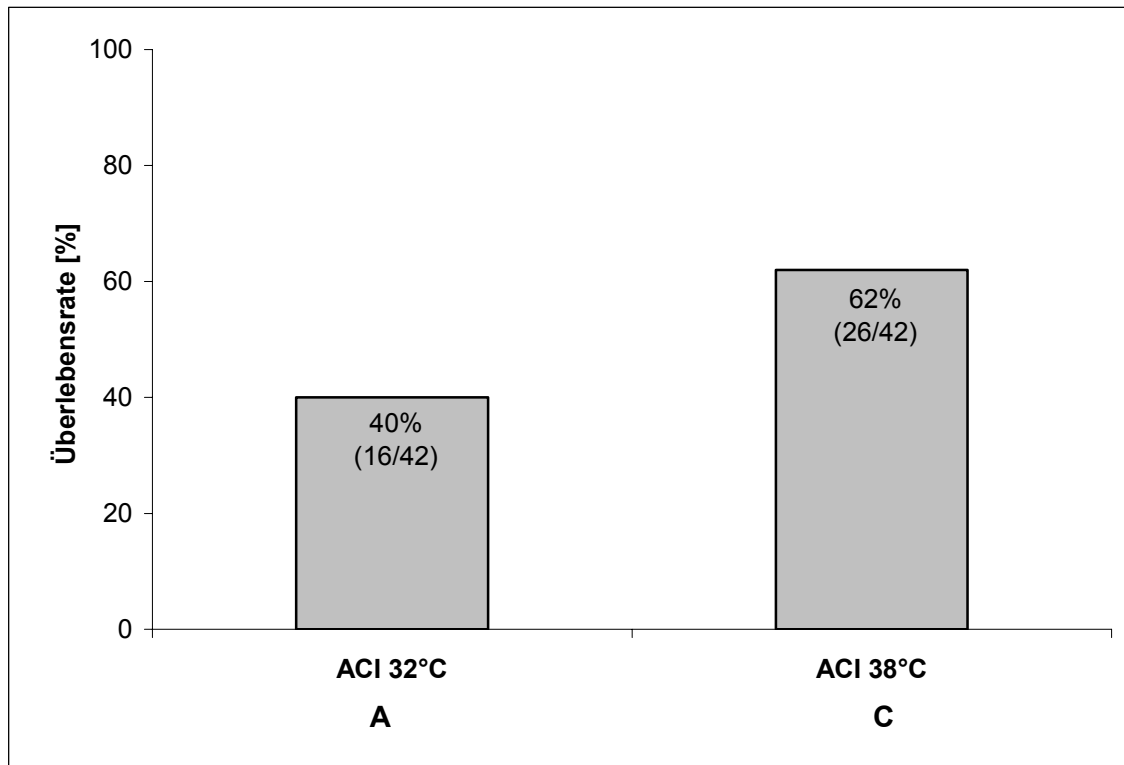


**Abb. 3.2: Einfluss von präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate; vor Interimsanalyse**

In der Versuchsreihe von  $n = 12$  Tiere pro Gruppe wurde der Effekt von präoperativer Hypothermie bei, durch abdominelle Kontamination und Infektion mit Stuhlkeimen (ACI) induzierter, Peritonitis (Gruppe A) mit perioperativer Normothermie (Gruppe C) verglichen. Eine Kontrollgruppe wurde ebenfalls gekühlt aber es wurde keine Peritonitis induziert (Gruppe B). Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Chi-Quadrat-Test über alle drei Gruppen:  $p = 0,024$ ; über Gruppen A und C:  $p = 0,08$ .

Diesem Versuch anschließend, wurde entsprechend des Gruppen-Sequenz Designs eine Zwischenanalyse durchgeführt. Basierend auf dem tatsächlich beobachteten Überlebensunterschied zwischen den Gruppen A und C (25%), wurde eine erneute Fallzahlberechnung durchgeführt, welche eine Gruppengröße von 42 Tieren ergab. Dies zugrunde legend, wurde der Versuch um weitere 30 Ratten in den Gruppen A und C ergänzt.

Nach Einschluss aller 42 Tiere in den Gruppen A und C in den Versuch wurde eine Überlebensrate von 40% bei den hypothermen Ratten (Gruppe A; 16 von 42) gefunden, hingegen eine Überlebensrate von 62% bei den normothermen Ratten (Gruppe C; 26 von 42). Im Chi-Quadrat-Test ergab sich eine statistische Signifikanz mit  $p = 0,048$  (Abb. 3.3).

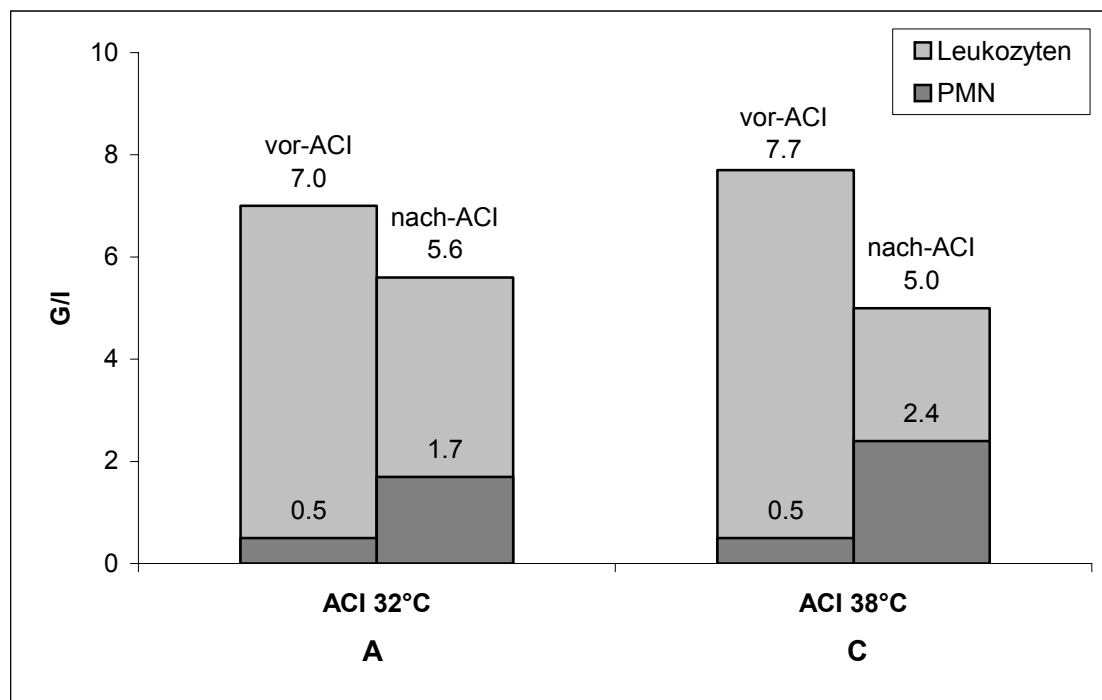


**Abb. 3.3: Einfluss einer präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate**

Dargestellt ist der Effekt von präoperativer Hypothermie (Gruppe A) im Vergleich mit perioperativer Normothermie (Gruppe C). Bei allen Ratten wurde durch abdominelle Kontamination und Infektion (ACI) eine Peritonitis induziert. Nach Interimsanalyse entsprechend des Gruppen-Sequenz Designs enthielten beide Gruppen je 42 Ratten ( $n = 42$ ). Die hypotherme Kontrollgruppe (Gruppe B) ohne Infektion ist hier nicht mehr dargestellt. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,048$ .

Weiterhin wurde, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, insgesamt 38 Tieren vor und nach Laparotomie Blut entnommen und die Zytokine MIP-2, IL-10 und IL-6, sowie ein Differentialblutbild bestimmt.

In Abbildung 3.4 sind vom Differentialblutbild auszugsweise die Leukozyten (gesamt) und die neutrophilen Granulozyten dargestellt. In der statistischen Auswertung anhand nichtparametrischer Tests ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede für die abhängigen Variablen Leukozytenzahl und neutrophile Granulozyten vor versus nach ACI: Leukozyten  $p = 0,01$ ; Granulozyten  $p = 0,001$ . Im Vergleich der Gruppen A und C miteinander errechneten sich durchweg nichtsignifikante Werte: Leukozyten vor ACI:  $p = 0,54$ ; Leukozyten nach ACI:  $p = 0,52$ ; Granulozyten vor ACI:  $p = 0,75$ ; Granulozyten nach ACI:  $p = 0,26$ .



**Abb. 3.4: Leukozyten und neutrophile Granulozyten bei präoperativer Hypothermie und Normothermie**

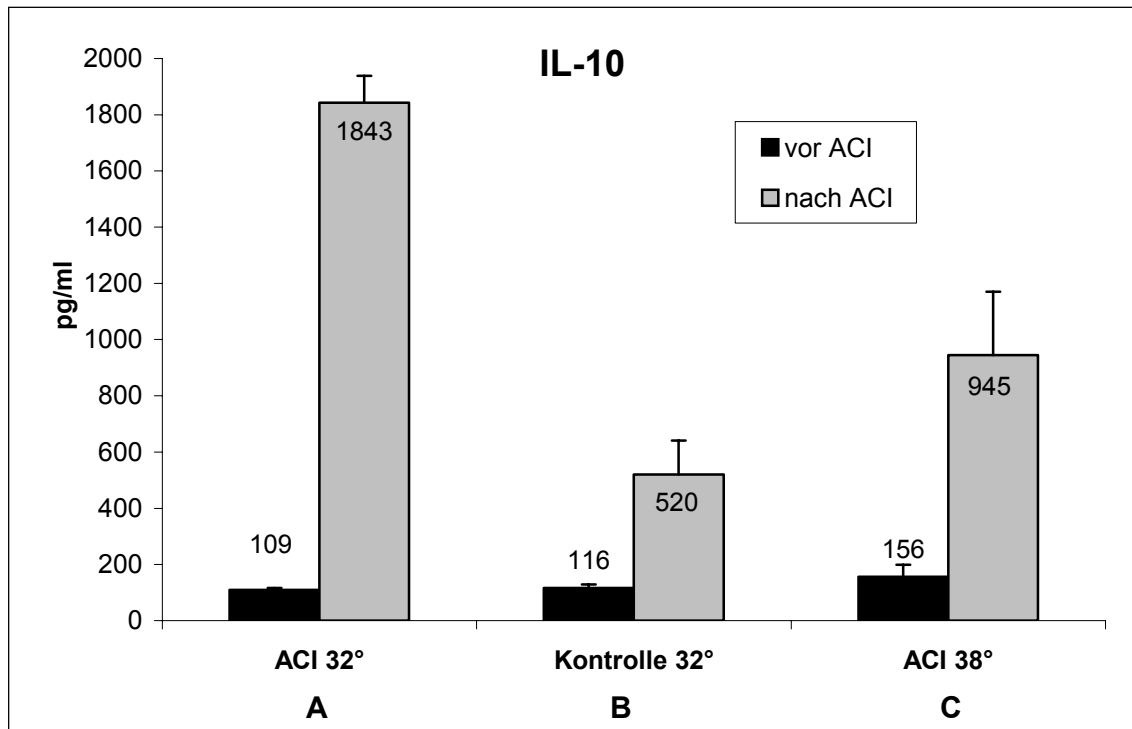
Dargestellt sind als Mittelwerte die Gesamtleukozytenzahl und die Zahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) im Vollblut eine Stunde vor und eine Stunde nach abdominaler Kontamination und Infektion (ACI, n = 6/Gruppe). Gruppe A wurde präoperativ gekühlt, Gruppe C behält Normothermie. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht).

Nicht-parametrischer Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Gruppen A und C: Leukozyten vor ACI: p = 0,54; Leukozyten nach ACI: p = 0,52; PMN vor ACI: p = 0,75; PMN nach ACI: p = 0,26.

Im Vergleich vor-Infektion/nach-Infektions war sowohl für das IL-10 als auch für das MIP-2 und IL-6 festzustellen, dass durch die abdominale Kontamination und Infektion (ACI) ein starker Anstieg um das vielfache der Ausgangswerte der Plasmaszytokinspiegel erfolgte. Die basalen IL-10, MIP-2 und IL-6 Werte vor Laparotomie sind den Abbildungen 3.5 – 3.7 zu entnehmen; in allen drei Fällen war kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen vor Infektion festzustellen.

Der durchschnittliche Plasmaspiegel des Zytokins IL-10 nach Infektion, war bei den gekühlten Tieren (Gruppe A) gegenüber den ungekühlten Tieren (Gruppe C)

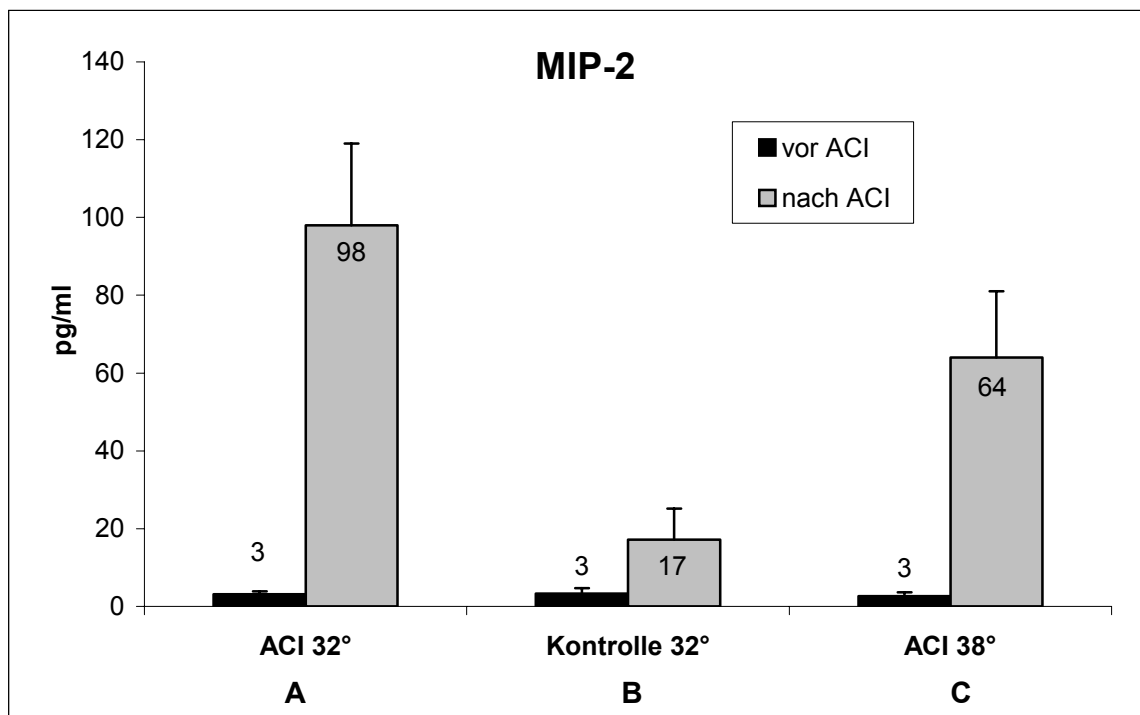
statistisch signifikant um etwa das zweifache erhöht (Gruppe C: 945pg/ml; Gruppe A: 1843pg/ml). In der nicht infizierten Gruppe (Gruppe B) betrug der Spiegel 520pg/ml ( $p = 0,001$ ). Im statistischen Einzelvergleich der Gruppen A und C (gekühlt gegen ungekühlt) anhand des Post-Hoc-Testes, errechnete sich ein  $p = 0,001$  (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: IL-10 Plasmaspiegel in Abhängigkeit von präoperativer Hypothermie**

Aus vor und nach abdominaler Kontamination und Infektion (ACI,  $\pm 1$  Stunde) entnommenem Blut, wurden die Plasmaspiegel des Zytokins IL-10 bestimmt ( $n = 6$ /Gruppe). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. Gruppe A wurde präoperativ gekühlt, Gruppe C behielt Normothermie. Gruppe B wurde als Kontrollgruppe gekühlt aber nicht infiziert. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Nicht parametrischer Test für abhängige Stichproben für IL-10 nach ACI:  $p = 0,001$ .

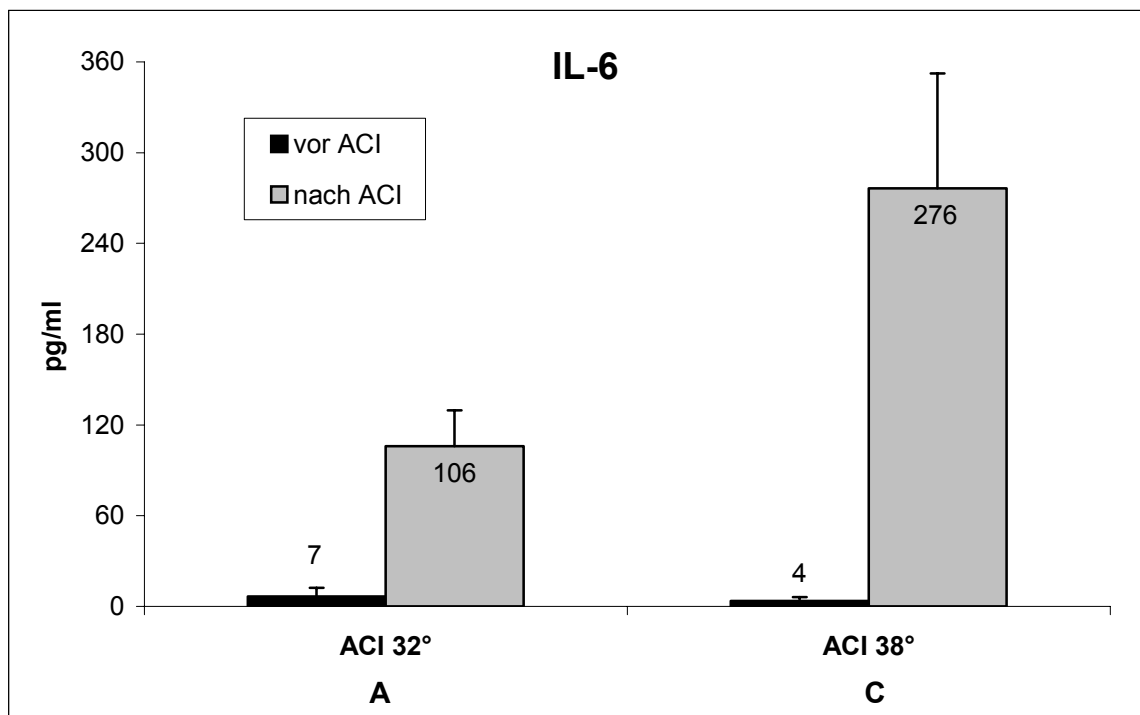
Bei der Messung des MIP-2 zeigte sich ein ähnliches Bild. Die gekühlten Tiere (Gruppe A) hatten einen gegenüber den normothermen Tieren (Gruppe C) erhöhten postinfektiösen Spiegel (98pg/ml zu 64pg/ml). Die nichtinfizierten Tiere (Gruppe B) wiesen einen MIP-2 Spiegel von 17pg/ml auf. Im nicht parametrischen Test für abhängige Stichproben zeigte sich eine statistische Signifikanz:  $p = 0,043$  (Abb. 3.6).



**Abb.3.6: MIP-2 Plasmaspiegel in Abhängigkeit von präoperativer Hypothermie**

Aus vor und nach abdominaler Kontamination und Infektion (ACI,  $\pm 1$  Stunde) entnommenem Blut, wurden die Plasmaspiegel des Zytokins MIP-2 bestimmt ( $n = 16$ /Gruppe). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. Gruppe A wurde präoperativ gekühlt, Gruppe C behielt Normothermie. Gruppe B wurde als Kontrollgruppe gekühlt aber nicht infiziert. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Nicht parametrischer Test für abhängige Stichproben für MIP-2 nach ACI:  $p = 0,043$ .

Anders als bei den Zytokinen IL-10 und MIP-2 war IL-6 in der gekühlten Gruppe (Gruppe A) supprimiert im Vergleich zu den normothermen Ratten (Gruppe C): 106pg/ml gegenüber 276pg/ml. Dieser Unterschied stellte sich in der statistischen Prüfung mittels des nicht parametrischen Tests als signifikant dar mit  $p = 0,047$  (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: IL-6 Plasmaspiegel in Abhängigkeit von präoperativer Hypothermie**

Aus vor und nach abdominaler Kontamination und Infektion (ACI,  $\pm 1$  Stunde) entnommenem Blut, wurden die Plasmaspiegel des Zytokins IL-6 bestimmt ( $n = 10$ /Gruppe). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.D. Gruppe A wurde präoperativ gekühlt, Gruppe C behielt Normothermie. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Nicht parametrischer Test für abhängige Stichproben für IL-6 nach ACI:  $p = 0,047$ .

### 3.2.2 Versuch 2: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie auf das Überleben (niedrige Komplexizität - keine Antibiotikaprophylaxe)

In der zweiten und dritten Versuchsreihe zur Hypothermie wurde, im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchsreihen, der Effekt von postoperativer Hypothermie bei durch Stuhlinokulum induzierter Peritonitis untersucht. Versuch 2 wurde ohne, Versuch 3 dagegen mit Antibiotikaprophylaxe durchgeführt.

In der normothermen Kontrollgruppe (Gruppe B) wurde eine Überlebensrate von 50% (5 von 10 Tieren) beobachtet. Bei den postoperativ gekühlten Tieren (Gruppe A) war das Überleben verschlechtert, es überlebten nur 10% der Tiere (Abb. 3.8 und 3.9).

Dieses Ergebnis stellt sich im Pearson-Chi-Quadrat-Test als signifikant dar:  $p < 0,05$ ;  $df = 1$ .

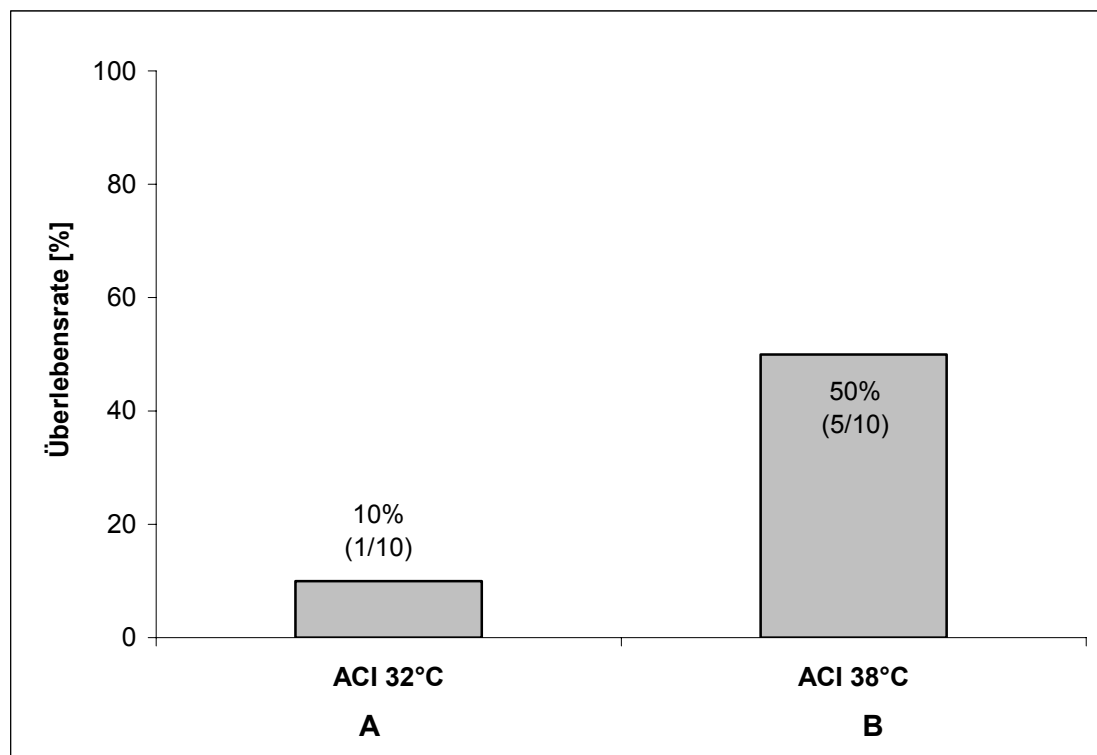


Abb. 3.8a



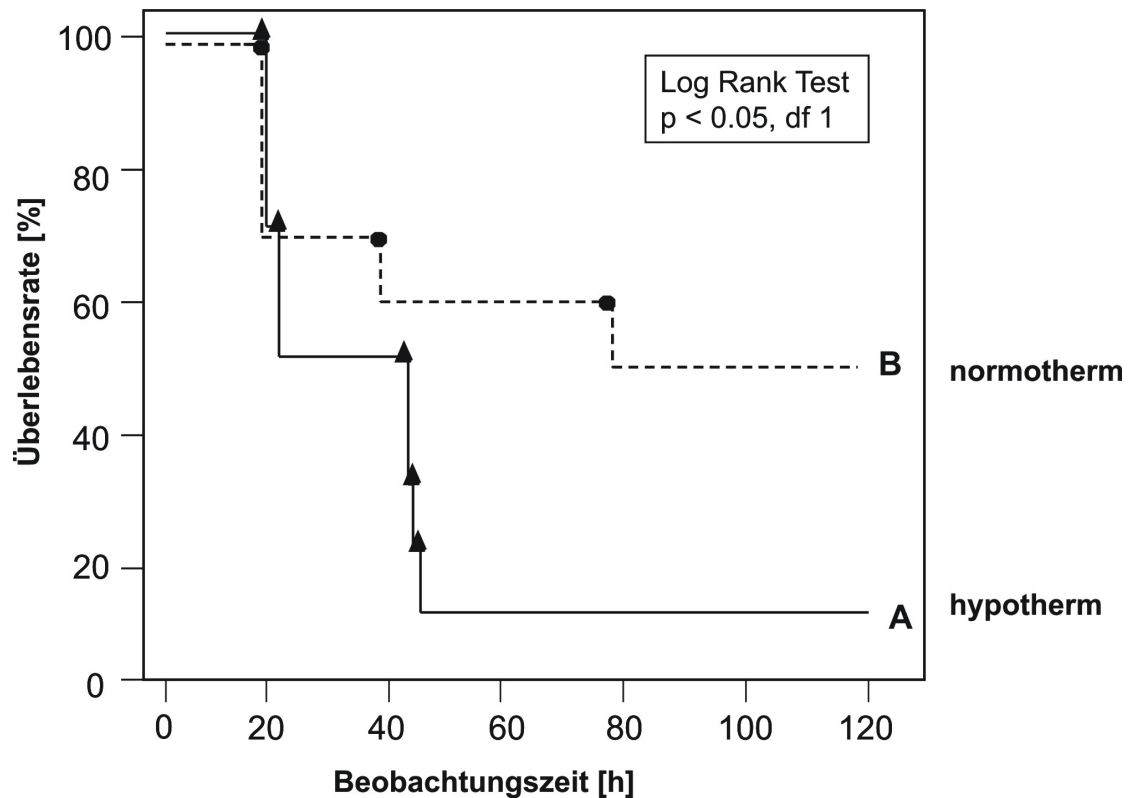


Abb. 3.8b

**Abb. 3.8: Einfluss von postoperativer Hypothermie auf das Überleben (ohne Antibiotikagabe)**

In der Versuchsreihe von  $n = 10$  Tieren pro Gruppe wurde der Effekt von postoperativer Hypothermie (Gruppe A) bei, durch abdominelle Kontamination und Infektion (ACI) induzierter, Peritonitis mit perioperativer Normothermie (Gruppe B) verglichen. Es erfolgte keine Antibiotikaprophylaxe. Dargestellt sind die Überlebensraten als Balkendiagramm (Abb. 3.7a) und die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (Abb. 3.7b). Chi-Quadrat-Test und Log Rank Test:  $p < 0,05$ .

### **3.2.3 Versuch 3: Der Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlich appliziertem G-CSF auf das Überleben, Differentialblutbild, Zytokinplasmaspiegel und Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten (höhere Komplexizität - mit Antibiotikaprophylaxe)**

In der dritten Versuchsreihe zur Hypothermie wurde der Effekt von postoperativer Hypothermie bei durch Stuhlinokulum induzierter Peritonitis untersucht (Gruppe A und C). Gruppe B wurde zusätzlich zur postoperativen Hypothermie prophylaktisch mit G-CSF behandelt. Anders als in Versuch 2 erhielten alle Tiere zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  und  $t = +1h$  eine intravenöse Antibiotikaprophylaxe mit Cefuroxim und Metronidazol in einer klinisch gebräuchlichen Dosierung (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht).

In der normothermen Kontrollgruppe (Gruppe C) wurde eine Überlebensrate von 50% beobachtet. Bei den postoperativ gekühlten Tieren (Gruppe A) war das Überleben verschlechtert, es überlebten nur 20% der 20 Tiere. In Gruppe B allerdings, die zusätzlich zur Hypothermie G-CSF erhielt, wurde eine Überlebensrate von 60% gefunden (Abb. 3.9).

In der statistischen Analyse mittels des Pearson-Chi-Quadrat-Testes errechnet sich über alle drei Gruppen ein  $p = 0,029$ . An dieses statistisch signifikante Ergebnis anschließend, wurden die Gruppen im Einzelnen gegeneinander getestet. Auch der Unterschied in der Überlebensrate zwischen Gruppe A und C, also postoperative Kühlung gegen perioperative Normothermie, ist statistisch signifikant mit  $p = 0,047$ . Der Unterschied in der Überlebensrate zwischen den gekühlten Tieren (Gruppe A) und den gekühlten Tieren, die zusätzlich eine G-CSF Prophylaxe erhielten (Gruppe B), stellt sich ebenfalls statistisch signifikant dar ( $p = 0,01$  im Chi-Quadrat-Test).

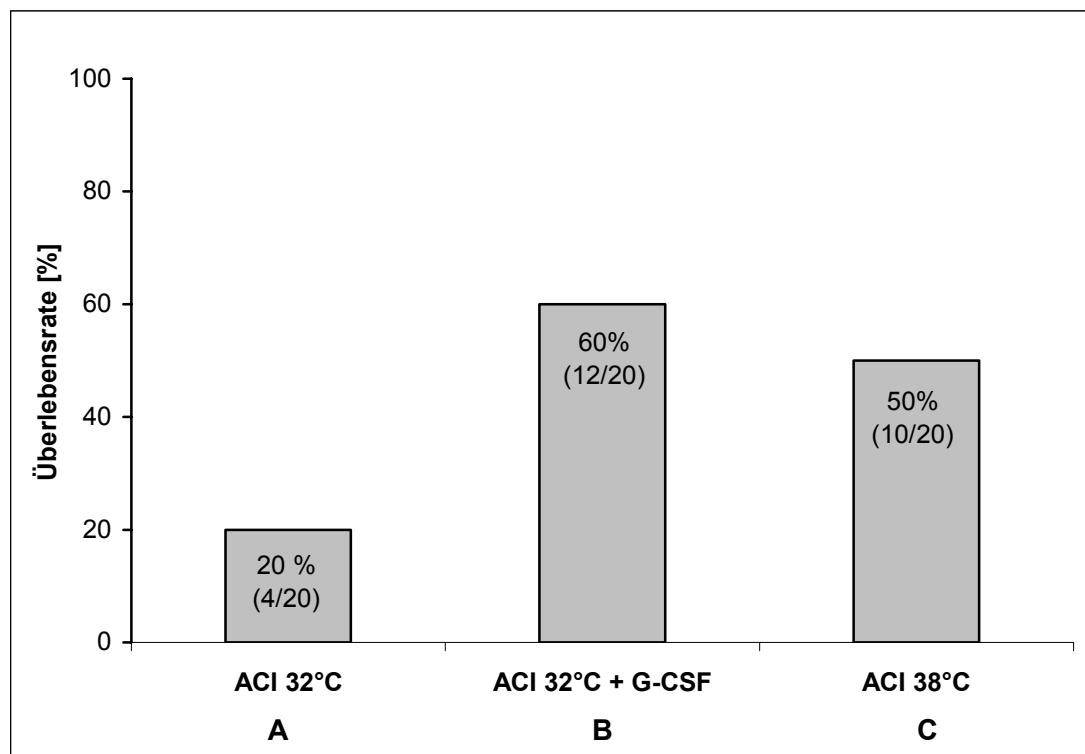


Abb. 3.9a

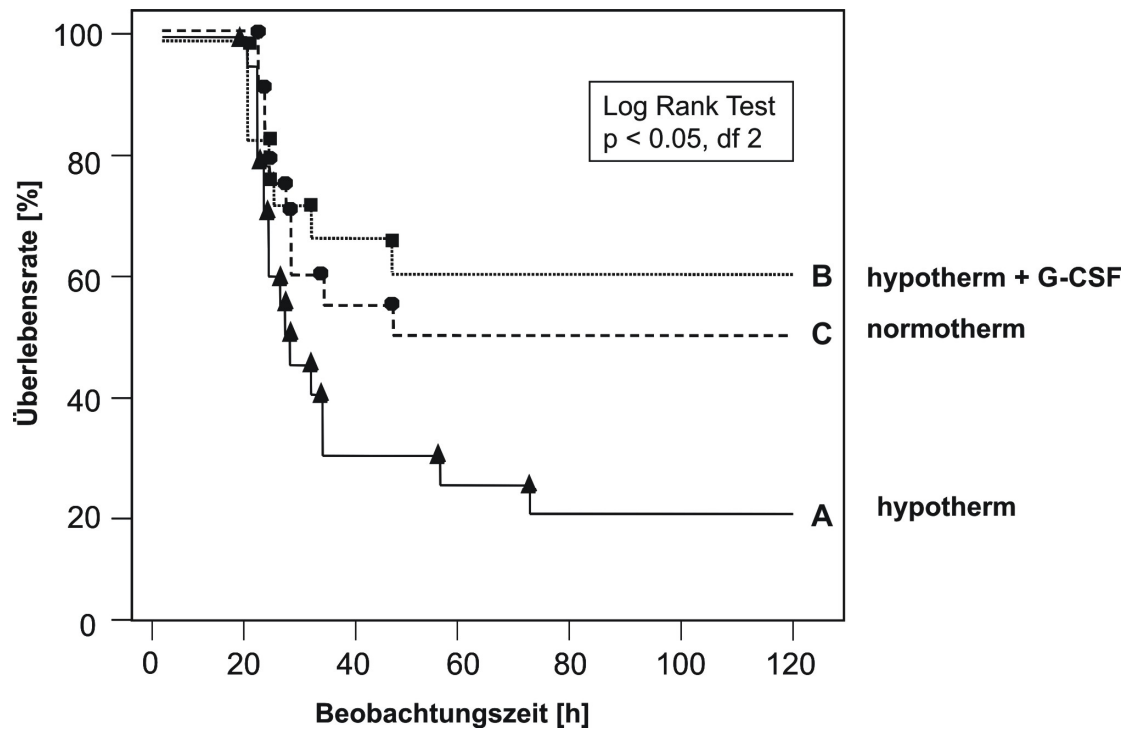
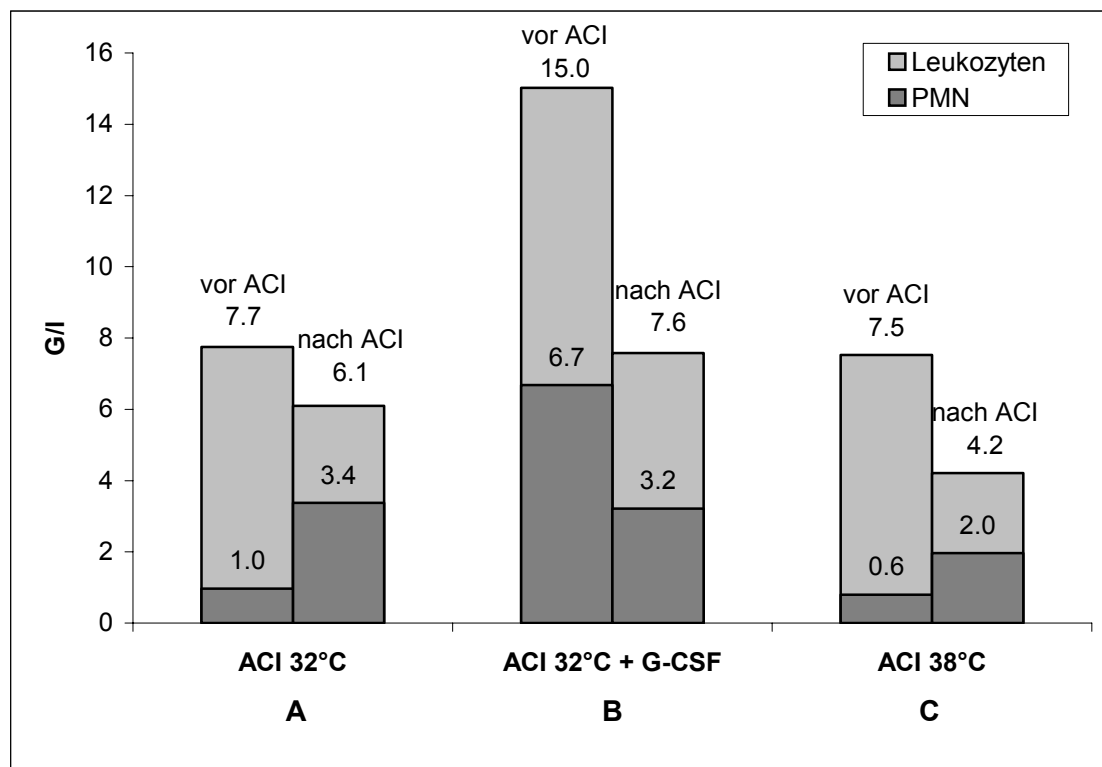


Abb. 3.9b

**Abb. 3.9: Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlicher G-CSF Applikation auf das Überleben (mit Antibiotikagabe)**

In der Versuchsreihe von  $n = 20$  Tiere pro Gruppe wurde der Effekt von postoperativer Hypothermie (Gruppe A) und zusätzlicher G-CSF Applikation (-12, +12, +36h,  $20\mu\text{kg}$  KG; Gruppe B) bei, durch abdominelle Kontamination und Infektion (ACI) induzierter, Peritonitis mit perioperativer Normothermie (Gruppe C) verglichen. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol ( $10$  und  $3,5\text{mg/kg}$  Körpergewicht). Dargestellt sind die Überlebensraten als Balkendiagramm (Abb. 3.8a) und die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (Abb. 3.8b). Chi-Quadrat-Test über alle drei Gruppen:  $p = 0,029$ ; Gruppe A gegen Gruppe C:  $p = 0,047$ ; Gruppe A gegen Gruppe B:  $p = 0,01$ . Log-Rank-Test über alle drei Gruppen:  $p < 0,05$ .

Allen Ratten wurde vor und nach Laparotomie Blut abgenommen und daraus ein Differentialblutbild erstellt und die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 gemessen. Außerdem wurde die Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten getestet. In Abbildung 3.10 sind vom Differentialblutbild auszugsweise die Leukozyten (gesamt) und die neutrophilen Granulozyten dargestellt. Wie erwartet sah man einen statistisch signifikanten Anstieg sowohl der Gesamtleukozytenzahl als auch der neutrophilen Granulozyten vor durchgeführter Laparotomie in der mit G-CSF vorbehandelten Gruppe (Gruppe B). Im nicht parametrischen Test ergab sich in beiden Fällen ein  $p < 0,001$ . Des Weiteren fiel ein stärkerer Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blut nach durchgeführter Infektion bei den nicht gekühlten Tieren (Gruppe C) im Vergleich zu der Kühlgruppe (Gruppe A) auf. In Gruppe C fand ein Abfall der zirkulierenden Leukozyten von 7,5 auf 4,2 G/l statt, in Gruppe A lediglich ein Abfall von 7,7 auf 6,1 G/l. Dies war statistisch signifikant mit einem  $p < 0,001$ . Selbige statistische Prüfung für die neutrophilen Granulozyten stellte sich als nicht signifikant dar ( $p = 0,27$ ).

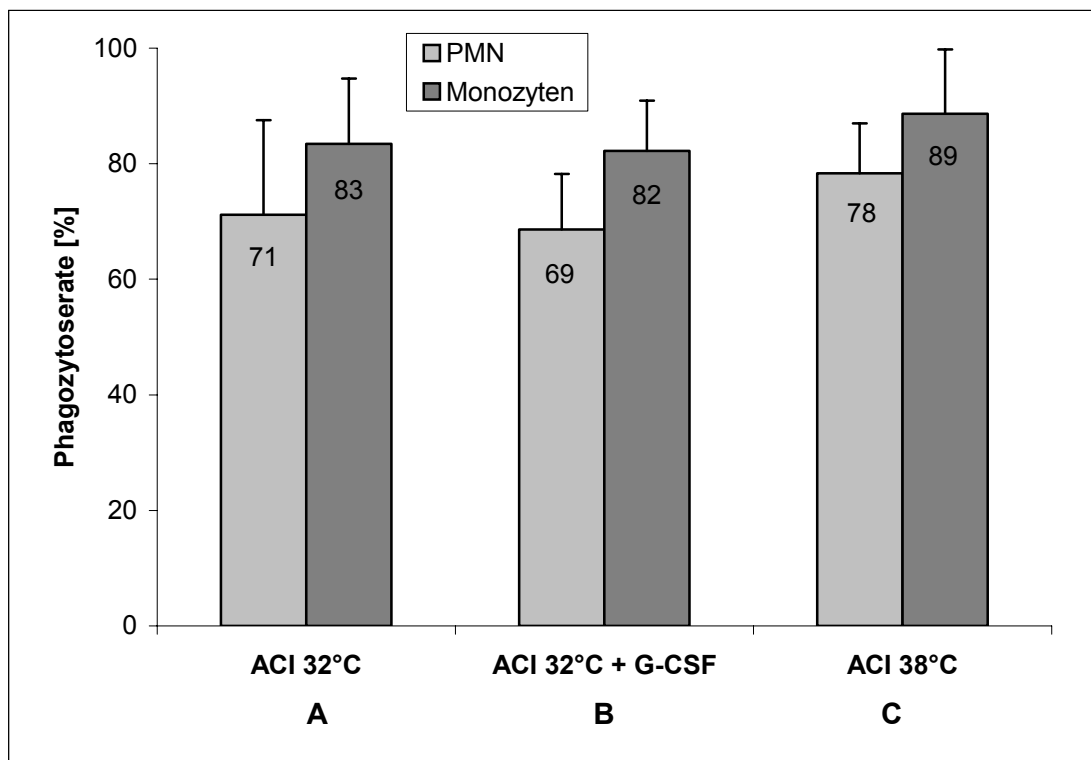


**Abb. 3.10: Leukozyten und neutrophile Granulozyten bei postoperativer Hypothermie und Normothermie, bzw. bei zusätzlicher G-CSF Prophylaxe**

Dargestellt sind als Mittelwerte die Gesamtleukozytenzahl und die Zahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) im Vollblut eine Stunde vor und eine Stunde nach abdominaler Kontamination und Infektion (ACI,  $n = 20$ /Gruppe). Gruppe A wurde postoperativ gekühlt, Gruppe B wurde ebenfalls gekühlt und erhielt zusätzlich eine G-CSF Prophylaxe (-12, +12, +36h,  $20\mu\text{/kg KG}$ ) und Gruppe C behielt Normothermie. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und  $3,5\text{mg/kg}$  Körpergewicht).

Nicht parametrischer Test: Leukozyten- sowie Granulozytenzahl vor ACI in Gruppe B im Vergleich zu Gruppen A und C:  $p < 0,001$ ; Leukozytenabfall im vor-zu-nach ACI Vergleich in Gruppe A verglichen mit C:  $p < 0,001$ .

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde außer dem Differentialblutbild auch die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach durchgeführter abdomineller Kontamination und Infektion gemessen (Abb. 3.11). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gefunden werden. Im nicht parametrischen Test ergab sich für die neutrophilen Granulozyten ein  $p = 0,112$  und für die Monozyten ein  $p = 0,384$ .



**Abb. 3.11: Die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei postoperativer Hypothermie und Normothermie, bzw. bei zusätzlicher G-CSF Prophylaxe**

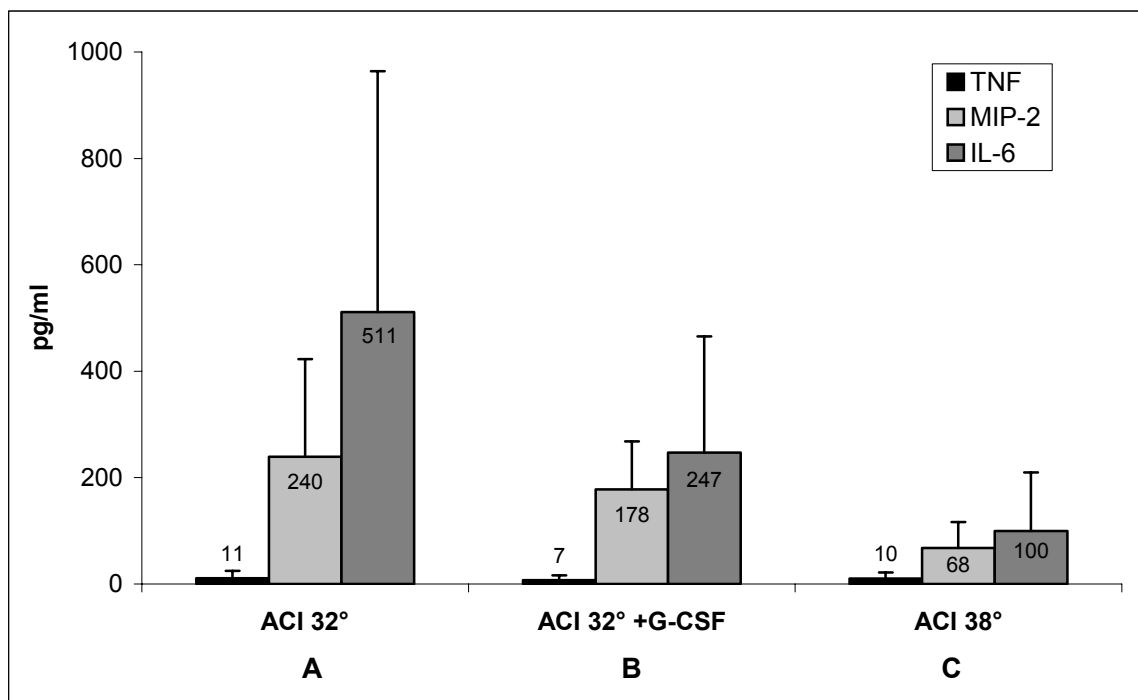
Dargestellt ist die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten (PMN) und Monozyten als Mittelwerte  $\pm$  S.D., eine Stunde nach durchgeführter abdomineller Kontamination und Infektion (ACI), gemessen in der jeweiligen Rate phagozytoseaktiver Zellen ( $n = 20$ /Gruppe). Gruppe A wurde postoperativ gekühlt, Gruppe B wurde ebenfalls gekühlt und erhielt zusätzlich eine G-CSF Prophylaxe (-12, +12, +36h,  $20\mu\text{/kg KG}$ ) und Gruppe C behält Normothermie. Nicht parametrischer Test für neutrophile Granulozyten:  $p = 0,112$ , für Monozyten:  $p = 0,384$ .

Weiterhin wurden die Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 aus den nach Infektion entnommenen Blutproben (+ 1 Stunde) bestimmt (Abb. 3.12). Für die Konzentrationen des TNF- $\alpha$  konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ( $p = 0,553$ ).

Der höchste MIP-2 Spiegel wurde mit 240pg/ml bei den gekühlten Tieren (Gruppe A) gemessen. Bei den normothermen Tieren (Gruppe C) betrug er lediglich 68pg/ml. Bei den Tieren mit G-CSF Prophylaxe (Gruppe B) wurde 178pg/ml gemessen. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant mit  $p < 0,001$ .

Für das IL-6 ergab sich ein sehr ähnliches Bild. Auch hier wurde der höchste Wert mit 511pg/ml in Gruppe A gemessen, der niedrigste mit 100pg/ml in Gruppe C. Gruppe B lag dazwischen mit 247pg/ml. Auch diese Unterschiede zeigten Signifikanz mit  $p < 0,001$ .





**Abb. 3.12: TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 Plasmaspiegel bei postoperativer Hypothermie und Normothermie, bzw. bei zusätzlicher G-CSF Prophylaxe**

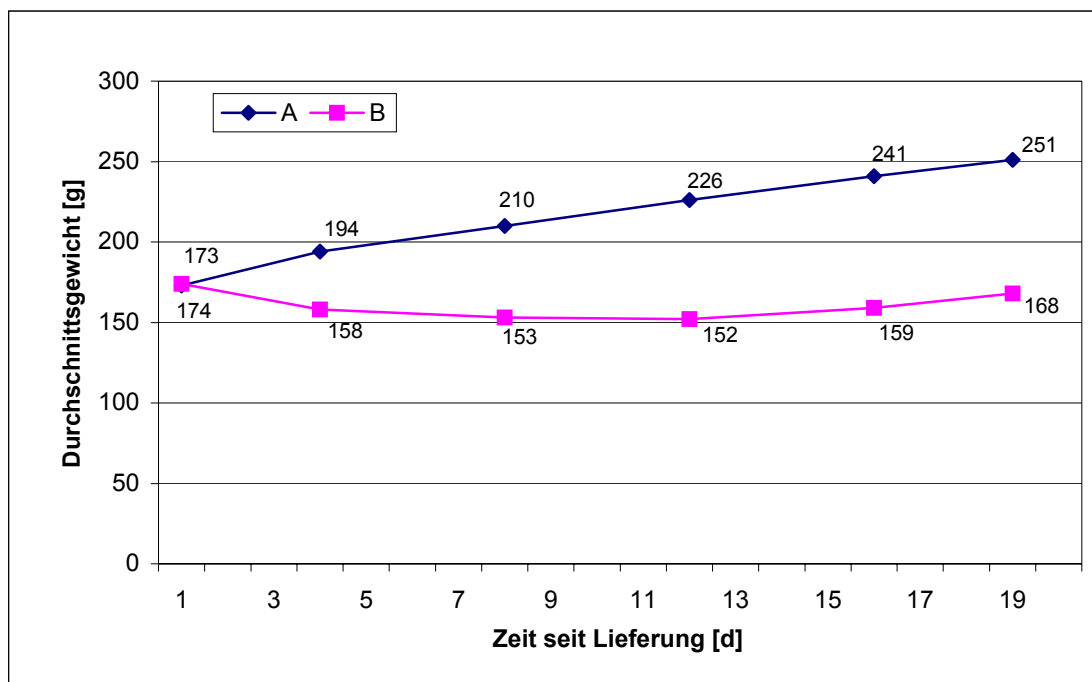
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. der Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 nach durchgeführter abdominaler Kontamination und Infektion (ACI, n = 20/Gruppe). Gruppe A wurde postoperativ gekühlt, Gruppe B wurde ebenfalls gekühlt und erhielt zusätzlich eine G-CSF Prophylaxe (-12, +12, +36h, 20 $\mu$ /kg KG) und Gruppe C behält Normothermie. Nicht parametrischer Test für TNF- $\alpha$ : p = 0,553; für MIP-2: p < 0,001; für IL-6: p < 0,001.

### **3.3 Versuchsreihe zur Unterernährung**

#### **3.3.1 Versuch 1: Vorversuch zur Etablierung der Entwicklung chronischer Unterernährung**

In diesem Versuch musste zuerst die Methodik zur Entwicklung einer chronischen Unterernährung etabliert werden. Das genaue Vorgehen ist im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

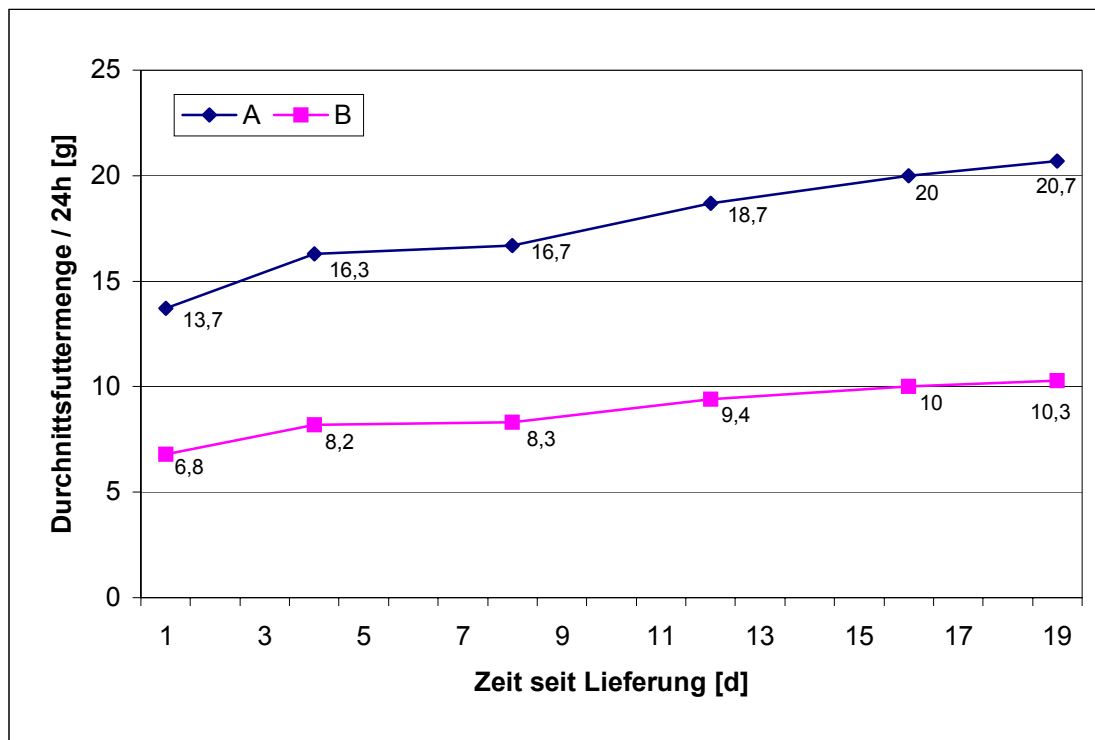
Bei der ersten Gewichtsmessung einen Tag nach Lieferung ergaben sich folgende Durchschnittswerte für beide Gruppen: Gruppe A (normal genährte Tiere): 173g, Gruppe B (unterernährte Tiere): 172g, wobei die Gewichtsverteilung bei den einzelnen Ratten sehr homogen war. Die Gewichtsentwicklung in Gruppe A über die 20 Tage stellte sich annähernd linear dar, mit einem Endgewicht von durchschnittlich 250g. Das Durchschnittsgewicht bei den unterernährten Tieren fiel initial leicht um 20g, stieg dann aber wieder um fast den gleichen Betrag, so dass am Tag 19 das Durchschnittsgewicht mit 168g leicht unter dem Ausgangsgewicht lag. Über den gesamten Zeitraum entwickelte sich also eine mittlere Gewichts Differenz zwischen beiden Gruppen von 83g (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Gewichtsentwicklung der normal ernährten und der unterernährten Tiere im 20tägigen Beobachtungszeitraum**

Dargestellt ist die mittlere Gewichtsentwicklung während der 20tägigen Unterernährungsphase (n = 5/Gruppe). Gruppe A ist normal ernährt und im Wachstum nicht beeinträchtigt, Gruppe B ist auf 50% Nahrung begrenzt. Die Gewichtserhebung fand alle drei bis vier Tage statt.

Neben der Gewichtsentwicklung wurde ebenfalls die konsumierte Futtermenge der Tiere protokolliert. Der durchschnittliche Futterverbrauch in den ersten 24h in Gruppe A betrug 13,7g. Somit wurde den Ratten der Gruppe B am folgenden Tag jeweils 6,8g zur Verfügung gestellt. Die weitere Entwicklung der Nahrungsaufnahme in Gruppe A stellte sich ebenfalls annähernd linear dar und stieg innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf 20,7g an. Gruppe B wurde strikt auf jeweils 50% dieser Werte eingeschränkt (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: 24 Stunden Nahrungsmengen der normal ernährten und der unterernährten Tiere im 20tägigen Beobachtungszeitraum**

Dargestellt ist die mittlere Nahrungsmenge pro Ratte in je 24 Stunden während der 20tägigen Unterernährungsphase ( $n = 5/\text{Gruppe}$ ). Gruppe A wurde das Futter ad libitum angeboten, Gruppe B wurde 50% dieser Menge des jeweiligen Vortages zur Verfügung gestellt. Die Nahrungsmengenmessung und Angleichung fand alle drei bis vier Tage statt.

Eine Beeinträchtigung der Tiere hinsichtlich einer Veränderung des Allgemeinzustandes (Fell, Aussehen) und des Verhaltens (Lethargie, Aggression) war nicht festzustellen.

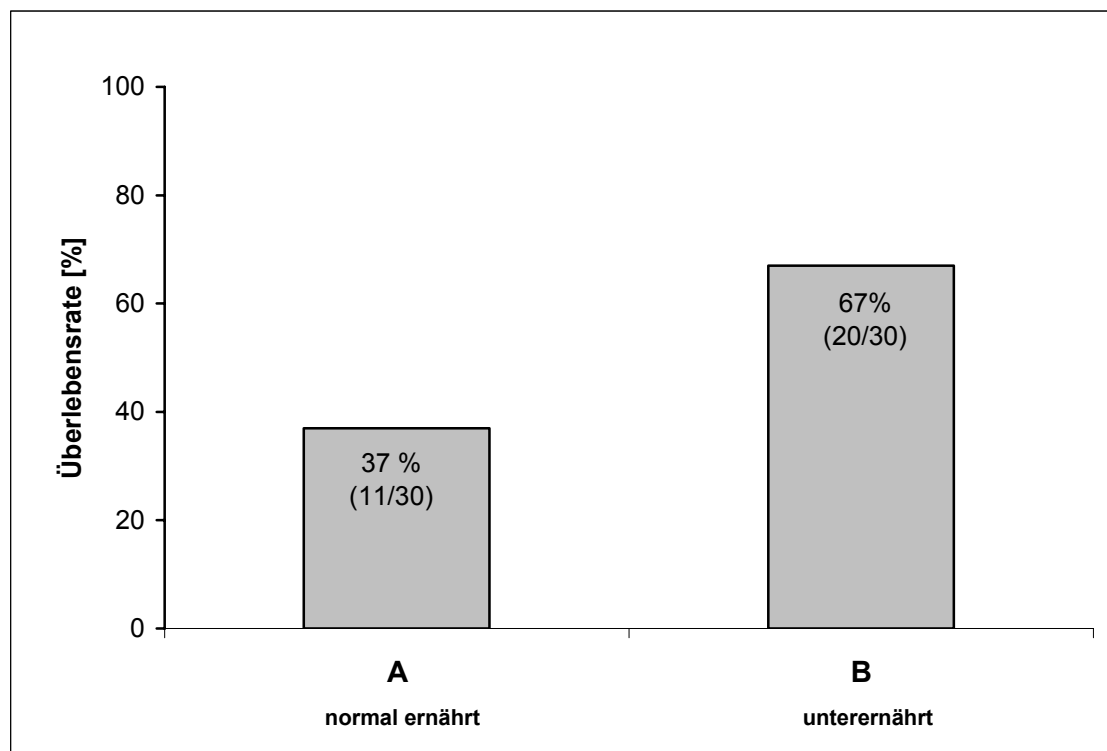
Nach Entwicklung der oben angegebenen Gewichtsdivergenz zwischen den beiden Gruppen wurden alle zehn Ratten am 20. Tag nach Lieferung operiert und eine abdominale Kontamination und Infektion (ACI) durchgeführt. Alle Tiere erhielten zu den Zeitpunkten  $t = -1h$  und  $t = +1h$  eine intravenöse Antibiotikaphylaxe mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Der primäre Endpunkt, die 120 Stunden Überlebensrate der septischen Tiere, erbrachte folgendes Ergebnis: In der normal ernährten Gruppe (Gruppe A) überlebten zwei von fünf Ratten. Dies entspricht einer 120 Stunden Überlebensrate von 40%. Von den unterernährten Tieren überlebte eines von fünf. Dies entspricht einer 120 Stunden Überlebensrate von 20%. Die statistische Prüfung der Gruppenunterschiede wurde im Hauptversuch durchgeführt.

### **3.3.2 Versuch 2: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Alter der Tiere beider Gruppen bei ACI**

Es wurde mit der in Versuch 1 erprobten Methodik dieser Hauptversuch mit einer größeren Tierzahl durchgeführt ( $n = 30$  Tiere pro Gruppe).

Die Gewichtsentwicklung stellte sich analog zum Vorversuch dar. Am Ende des dreiwöchigen Unterernährungszeitraumes wiesen die normal ernährten Tiere (Gruppe A) ein durchschnittliches Gewicht von 282g auf. In der unterernährten Gruppe B war dieses bei 162g durchschnittlich 120g geringer.

Entgegen der im Vorversuch beobachteten Tendenz überlebten in Versuch 2 nur 37% aller normal ernährten Tiere aus Gruppe A. In Gruppe B hingegen überlebten 67% der Tiere die induzierte Peritonitis (Abb. 3.15). Dies ist ein Unterschied zwischen beiden Gruppen von neun Tieren. In der statistischen Auswertung mittels des Chi-Quadrat-Testes stellte sich dieser Unterschied als signifikant dar;  $p = 0,038$ .



**Abb. 3.15: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate bei gleichem Alter der Tiere beider Gruppen**

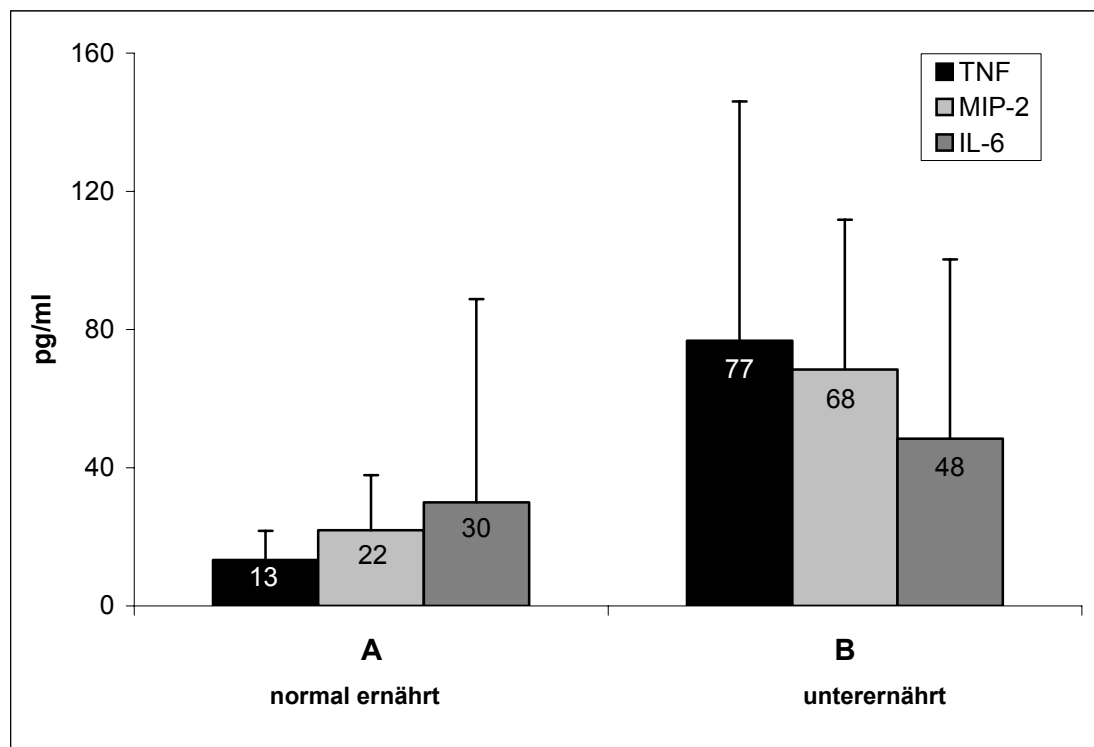
Dargestellt ist der Einfluss von chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate ( $n = 30/\text{Gruppe}$ ). Die Tiere in Gruppe A waren normal ernährt, den Tieren der Gruppe B wurde über drei Wochen 50% Nahrung entzogen. Zum Zeitpunkt der Infektion hatten die Tiere beider Gruppen das gleiche Alter, unterschieden sich aber im Gewicht um durchschnittlich 120g. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,038$ .

Weiterhin wurde sieben Tieren pro Gruppe eine Stunde nach Laparotomie Blut abgenommen und die Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 gemessen.

Der durchschnittliche Plasmaspiegel des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  war bei den unterernährten Tieren (Gruppe B) gegenüber den normal ernährten Tieren (Gruppe A) statistisch signifikant um etwa das sechsfache erhöht (Gruppe A: 13pg/ml, Gruppe B: 77pg/ml). Im nicht parametrischen Test ergab sich  $p = 0,032$ .

Bei der Messung des Chemokins MIP-2 ergab sich ein ähnliches Bild. Die Tiere der Gruppe B wiesen mit 68pg/ml einen etwa dreifach höheren Plasmaspiegel auf als Gruppe A mit 22pg/ml. Dieser Unterschied stellte sich mit einem  $p = 0,03$  als statistisch signifikant dar.

Bei dem Zytokin IL-6 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. In Gruppe A wurde ein durchschnittlicher Spiegel von 30pg/ml gemessen, in Gruppe B ein Spiegel von 48pg/ml (Abb. 3.16). Es errechnete sich ein  $p = 0,577$ .



**Abb. 3.16: TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 Plasmaspiegel bei chronischer Unterernährung bzw. normalem Ernährungszustand bei gleichem Alter aller Tiere**

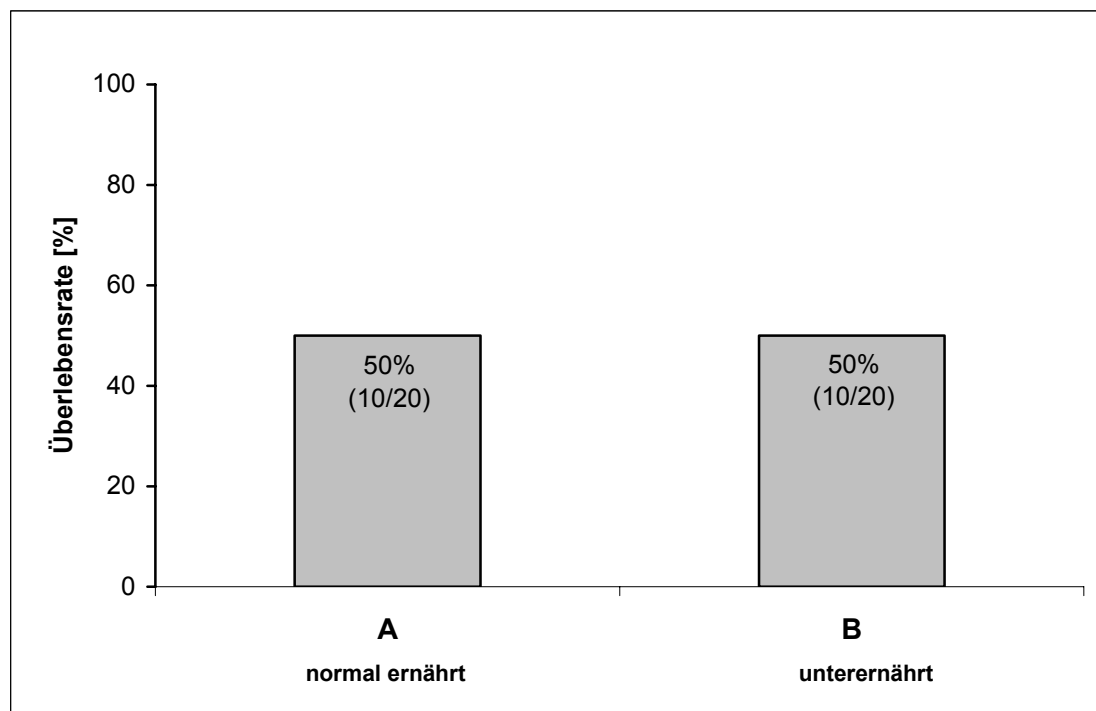
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. der Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 nach durchgeführter abdomineller Kontamination und Infektion ( $n = 7$ /Gruppe). Gruppe A war normal ernährt, Gruppe B wurde über drei Wochen auf 50% Nahrung beschränkt. Zum Zeitpunkt der Infektion hatten die Tiere beider Gruppen das gleiche Alter, unterschieden sich aber im Gewicht um durchschnittlich 120g. Nicht parametrischer Test für TNF- $\alpha$ :  $p = 0,032$ ; für MIP-2:  $p = 0,03$ ; für IL-6:  $p = 0,577$ .



### **3.3.3 Versuch 3: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Gewicht der Tiere beider Gruppen bei ACI**

In diesem Versuch wurde analog zu Versuch 2 verfahren, mit der Änderung, dass die Tiere nicht einer Lieferung entstammten und somit nicht gleichen Alters waren. Die Gewichtsentwicklung in der unterernährten Gruppe B stellte sich analog zu den Versuchen 1 und 2 dar. Das durchschnittliche Gewicht bei Lieferung betrug 163g und nach drei Wochen Nahrungsentzug (50%) 172g. Die Tiere der normal ernährten Gruppe A wurden erst vier Tage vor dem Versuchstag geliefert um ein an Gruppe B angeglichenes Gewicht zu erzielen. Am Versuchstag wogen diese Tiere durchschnittlich 182g.

In beiden Gruppen wurde eine 120 Stunden Überlebensrate von 50% nach durchgeführter abdomineller Kontamination und Infektion gefunden (Abb. 3.17). Somit konnte bezüglich der Überlebensrate bei normal ernährten bzw. chronisch unterernährten Tieren kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Chi-Quadrat-Test:  $p = 1$ .



**Abb. 3.17: Einfluss der chronischen Unterernährung auf die Überlebensrate bei gleichem Gewicht der Tiere beider Gruppen**

Dargestellt ist der Einfluss von chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate ( $n = 20/\text{Gruppe}$ ). Die Tiere in Gruppe A waren normal ernährt, den Tieren der Gruppe B wurde über drei Wochen 50% Nahrung entzogen. Zum Zeitpunkt der Infektion hatten die Tiere beider Gruppen annähernd das gleiche Gewicht, unterschieden sich aber im Alter. Antibiotikaprophylaxe erfolgte bei allen Tieren mit Cefuroxim und Metronidazol (10 und 3,5mg/kg Körpergewicht). Chi-Quadrat-Test:  $p = 1$ .

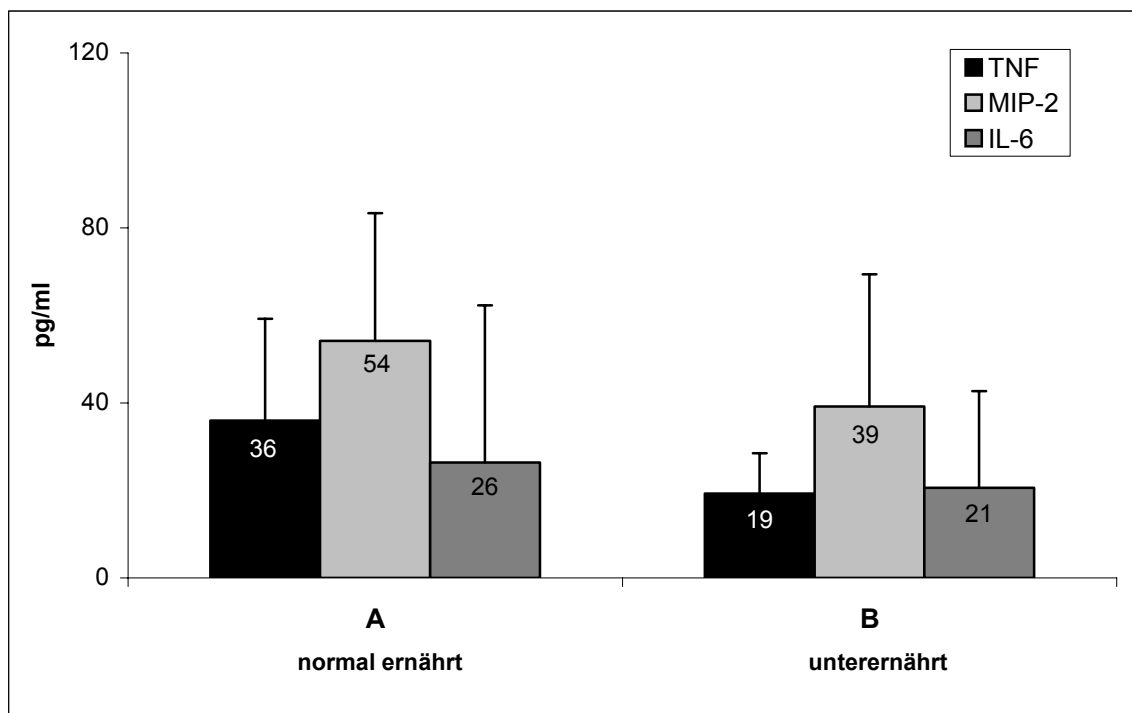
Auch in diesem Versuch wurde sieben Ratten pro Gruppe eine Stunden nach Laparotomie Blut abgenommen und daraus die Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 bestimmt (Abb. 3.18).

Der Unterschied der Zytokinspiegel zwischen beiden Gruppen war bei allen drei gemessenen Zytokinen statistisch nicht signifikant.

In Gruppe A betrug der durchschnittliche TNF- $\alpha$  Gehalt 36pg/ml wogegen in Gruppe B 19pg/ml gemessen wurde. Nicht parametrischer Test für unabhängige Stichproben:  $p = 0,127$ .

Der MIP-2 Gehalt betrug in Gruppe A 54pg/ml, in Gruppe B 39pg/ml ( $p = 0,399$ ).

In Gruppe A wurde für das Zytokin IL-6 ein Plasmaspiegel von 26pg/ml gemessen, in Gruppe B betrug dieser 20pg/ml ( $p = 0,74$ ).



**Abb. 3.18: TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 Plasmaspiegel bei chronischer Unterernährung bzw. normalem Ernährungszustand bei gleichem Gewicht beider Gruppen**

Dargestellt sind die Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 nach durchgeführter abdomineller Kontamination und Infektion als Mittelwerte  $\pm$  S.D. ( $n = 7$ /Gruppe). Gruppe A war normal ernährt, Gruppe B wurde über drei Wochen auf 50% Nahrung beschränkt. Zum Zeitpunkt der Infektion hatten die Tiere beider Gruppen ein annähernd gleiches Gewicht, unterschieden sich aber im Alter. Nicht parametrischer Test für unabhängige Stichproben für TNF- $\alpha$ :  $p = 0,127$ ; für MIP-2:  $p = 0,399$ ; für IL-6:  $p = 0,74$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 CMRTs

Trotz jahrzehntelanger intensiver experimenteller und klinischer Forschung, stellt die Sepsis heute mehr als je zuvor ein zentrales Problem auf der Intensivstation dar. Zwar ist es durch die immensen Fortschritte in der Intensivmedizin gelungen, die Gesamtmortalität innerhalb der letzten 25 Jahre von 28 auf 18% zu senken, dennoch wird die Mortalität bei septischem Schock mit Multiorganversagen mit bis zu 70% angegeben.<sup>118</sup> Zusätzlich steigt die Inzidenz der Sepsis jährlich um 8,7% an, so dass die Anzahl an Todesfällen von Jahr zu Jahr größer wird.<sup>118</sup>

Eine Vielzahl an Tierversuchen wurde innerhalb der letzten 20 Jahre durchgeführt, mit der Zielsetzung eine Therapiemöglichkeit auf immunmodulatorischer Ebene zu finden.<sup>2;26;33;64;65;205</sup> Viele dieser Versuche zeigten vielversprechende Ergebnisse in der Phase der Tierversuche. Bei anschließenden klinischen Studien verfehlten allerdings die meisten dieser Ansätze das Ziel, den positiven Effekt bei Tieren am Menschen zu reproduzieren. Mitunter wurden sogar negative Effekte am Menschen beobachtet.<sup>88;204</sup> Zwar ist die Physiologie von Mensch und Tier nicht völlig gleich, aber allein dies ist sicherlich nicht der alleinige Grund für die Diskrepanz zwischen Tier- und klinischen Studien. Vielmehr muss man hier das Design und die Durchführung der Tierversuche diskutieren. Die meisten der oben aufgeführten Studien wurden „reduktionistisch“, in klinisch nicht relevanter Form mit niedriger Komplexität durchgeführt.<sup>17;20</sup> Beispielsweise wurde in den Versuchen entweder keine Antibiotikaphylaxe durchgeführt, oder in klinisch unüblicher Dosierung bzw. Verabreichung (intramuskulär, intraperitoneal). Solchen Tierstudien gelingt es nicht die komplexe Situation eines septischen Patienten nachzubilden.

In dem in dieser Dissertation verwendeten Tiermodell, den „Clinic modeling randomized trials“ (CMRTs), ist das Nachbilden der klinischen Komplexität ein integraler Bestandteil.<sup>110</sup> Neben klinisch relevanten Fallzahlberechnungen, Randomisierung, Verblindung und statistischer Analyse, werden die Ratten mehreren Interventionen unterzogen. So erhält jedes Versuchstier eine perioperative Antibiotikaphylaxe, Volumensubstitution, Anästhesie, Laparotomie und

peritoneale Infektion mit einer standardisierten humanen Stuhlsuspension, sowie eine postoperative Analgesie. Erst kürzlich wurde auch in anderen Tiermodellen eine Antibiotikaprophylaxe als wichtiger Aspekt für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen diskutiert.<sup>184;190</sup> In CMRTs ist seit Ihrer Entwicklung eine perioperative Antibiose in klinisch üblicher Dosierung enthalten.<sup>20</sup>

Aufgrund dieser Komplexität ist das hier verwendete Tiermodell von klinischer Bedeutung und eignet sich besonders gut für die Evaluation von perioperativen Risikofaktoren. Da nicht jeder potentielle Risikofaktor auch im komplexen klinischen Umfeld, insbesondere der perioperativen Phase und der Intensivstation, große Bedeutung trägt,<sup>198</sup> muss das Studiendesign möglichst weit der tatsächlichen Situation angeglichen werden. Das hier gewählte Tiermodell entspricht diesen Voraussetzungen und ist deshalb für die Bearbeitung der Fragestellung als relevant anzusehen.

In der Forderung, das Studiendesign so nah wie möglich der klinischen Realität anzugleichen, liegen auch die Limitationen des gewählten Tiermodells. In einem Paper bearbeitete Esmon die Fragestellung, warum Tiermodelle nicht in der Lage sind, Sepsis beim Menschen adäquat nachzubilden.<sup>60</sup> Er weist darauf hin, dass in der klinischen Realität die große Mehrheit septischer Patienten auf der Intensivstation versorgt werde, unter Zuhilfenahme von künstlicher Beatmung am Respirator, Volumensubstitution und Vasopressortherapie. Zwar schließt das gewählte Modell die Volumensubstitution ein, nicht aber eine gezielte Unterstützung der Atmung oder des Blutdruckes. Dies ist möglicherweise deshalb von Bedeutung, da die Lungenfunktion eine entscheidende Rolle beim Sepsis Outcome spielt.<sup>60</sup> Allerdings ist hier ein Punkt erreicht, an dem die Durchführbarkeit der Tierversuche nicht mehr gewährleistet wäre.

Weiterhin limitierend ist der Fakt, dass die Mehrheit der septischen Patienten entweder sehr alt, oder Neugeborene sind. Die allermeisten der Sepsismodelle am Tier, wie auch das hier gebrauchte, verwenden Tiere im jungen Erwachsenenalter. Dies schränkt die Generalisierbarkeit der Studienergebnisse ein.<sup>60</sup>

## 4.2 Stuhl-Dosis-Wirkungskurve

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Tierversuchen ist ihre Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit. Um dies zu gewährleisten, wurde eine Stuhl-Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb. 3.1), mit dem Ziel, die zu inokulierende Stuhldosis zu identifizieren, die zu einer Mortalität von 30-50% führt. Dies entspricht in etwa der Mortalität bei septischem Schock.<sup>70</sup>

Mit einer Überlebensrate von 100% bei einer Dosis von 1,4ml/kg KG, 10% bei 2,6ml/kg KG und einem Überleben von 60% bei sowohl 1,8 als auch 2,2ml/kg KG, ergab sich eine klare Abhängigkeit der Mortalität von der inokulierten Stuhldosis (siehe Abb. 3.1). Im statistischen Test stellte sich dieser Zusammenhang als signifikant dar. Im mittleren Bereich lässt sich keine Differenzierung zwischen den Dosierungen vornehmen. Dies ist möglicherweise mit der Gruppengröße von nur n = 10 zu erklären. Nichtsdestotrotz kann man durch extrapolieren der Daten die Stuhldosis schätzen, die nötig ist, um eine Mortalität von etwa 40% (Überlebensrate von 60%) zu erzielen. Diese Dosis entspricht 1,9ml/kg KG und wurde entsprechend für die weiteren Versuche dieser Dissertation zugrunde gelegt, mit Ausnahme von Versuch 2 der Hypothermierihe (siehe 2.4.1.2). In diesem Versuch wurde keine Antibiotikaphylaxe durchgeführt. Um auf ähnliche Mortalitätswerte in der Kontrollgruppe zu kommen, wurde in diesem Versuch nur 50% dieser Dosis (1 ml/kg KG) verwendet.

Schon in früheren Versuchsreihen mit dem CMRT Modell wurde durch Erstellen von Stuhl-Dosis-Wirkungskurven die Beziehung von Mortalität und Stuhldosis und damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufgezeigt.<sup>20;110</sup>

Das hier gewählte Modell ist somit besser standardisierbar und reproduzierbar als andere Tiermodelle der intra-abdominellen Sepsis, wie beispielsweise das „cecal ligation and puncture, CLP“ Modell.<sup>197</sup> Es wurde gezeigt, dass die Variabilität bezüglich der Länge der Ligatur, sowie die Lokalisation, Anzahl und Durchmesser der Durchstechungen des Kolons, ausgeprägten Einfluss auf die erzielte Mortalität nehmen.<sup>174</sup> Dies verursacht Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit von Studienergebnissen.

### 4.3 Versuchsreihe zur Hypothermie

Perioperative Hypothermie ist ein Zustand, dem der Anästhesist täglich gegenüber steht. In der Mehrzahl aller Operationen kommt es zu einem ungewollten Abfall der Körpertemperatur um mehr als 2°C.<sup>142</sup> Obwohl klar ist, dass perioperative Unterkühlung ein Risikofaktor für ein negatives Outcome ist, wird die induzierte Hypothermie als eine adjunktive Therapieform, beispielsweise nach Herz-Kreislauf-Stillstand propagiert und findet klinisch mehr und mehr Einsatz.<sup>146</sup>

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss von perioperativer Hypothermie auf das postoperative Sepsisoutcome überprüft. Der Zustand der induzierten Hypothermie wurde durch eine Kühlung der Versuchstiere über eine Stunde vor Beginn der Operation erzielt. Die postoperative Unterkühlung hingegen, wurde durch eine Kühlung der Tiere über eine Stunde unmittelbar nach Operation simuliert. Da die durchgeführte Laparotomie pro Versuchstier nur wenige Minuten dauerte, entspricht die Kühlung unmittelbar nach Operation weitestgehend einer ungewollten Unterkühlung, die während einer längeren Operation auftritt und für eine gewisse Zeit nach Ende der Operation fortbesteht. Im Weiteren werden beide Zustände als präoperative bzw. postoperative Hypothermie bezeichnet.

Es ist bekannt, dass Hypothermie viele negative Auswirkungen auf den Organismus hat.<sup>142;147</sup> So kann es beispielsweise unter Hypothermie zu schweren kardiovaskulären Komplikationen kommen.<sup>67</sup> Ventrikuläre Tachykardien, Asystolien und Myokardinfarkte sind beobachtet worden.<sup>68</sup> Weiterhin kann es zu Störungen der Gerinnungsfunktion kommen, sowie zu Flüssigkeitsverlusten durch hypothermieinduzierte Diurese.<sup>84;147</sup>

Aus früheren Versuchen im CMRT Design ist bekannt, dass es bei den Ratten im septischen Verlauf nur zu moderaten Depression von Puls und Blutdruck kommt.<sup>21</sup> Torbati et al. berichteten, dass sogar zwei Stunden systemische Hypothermie bei Ratten in Kombination mit Anästhesie nur geringe Auswirkungen auf kardiovaskuläre Parameter zeigt.<sup>182</sup> Ebenfalls senkte Hypothermie die spontane Ventilation der Ratten nur gering, solange die Körpertemperatur über 31° gehalten wurde. Die geringe



Depression der Ventilation zeigte in der Studie keinen Einfluss auf die arterielle Oxygenation.<sup>182</sup>

Aus diesen Beobachtungen wurde für die vorliegende Studie geschlossen, dass eine einstündige milde Hypothermie von 32°C ohne das Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen durchgeführt werden konnte.

Auch das Risiko durch hypothermieinduzierte Flüssigkeitsverluste, wurde durch die im Design vorgesehene perioperative Volumensubstitution abgemildert. Der Zweck der Volumensubstitution war nicht etwa eine Optimierung der Sepsistherapie. Daher wurde sowohl vor als auch nach Infektion das gleiche Volumen substituiert. Möglicherweise hätte man durch eine aggressivere Volumengabe nach Infektion eine Verbesserung des Sepsisoutcomes erzielen können, was aber nicht die Zielsetzung dieser Studie war.

Weiterhin wurde die Wiedererwärmung nach Ende der hypothermen Phase langsam durchgeführt, um das Risiko eines Kreislaufkollapses zu minimieren.<sup>185;186</sup>

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Tierversuche unter Hypothermie mit nur einem geringen Risiko von lebensbedrohlichen systemischen Nebenwirkungen durchführbar waren. In der Tat ist keines der Versuchstiere innerhalb der unmittelbaren perioperativen Phase verstorben.

#### **4.3.1 Der Einfluss von präoperativer Hypothermie auf die Überlebensrate, Zytokinausschüttung und Differentialblutbild**

Neben den erwähnten schweren Nebenwirkungen der Hypothermie, über die in der Literatur weitestgehend Einigkeit herrscht, muss man die Auswirkungen auf das Immunsystem diskutieren. Hier herrschen durchaus kontroverse Meinungen vor. In vielen *in-vitro*-Studien wie Tierversuchen wurde gezeigt, dass Hypothermie per se die systemische Immunreaktion supprimiert.<sup>160;164</sup> Dies wiegt wahrscheinlich nur gering in der Abwesenheit von Kontamination und Infektion. Dies wird in der vorliegenden Studie bestätigt: es wurde eine 100%ige Überlebensrate der hypothermen Kontrollgruppe beobachtet, die keiner Stuhlinokulation unterzogen wurde (siehe Abb. 3.2).

Hingegen war die Mortalität bei infizierten Ratten, die einer einstündigen präoperativen Hypothermie ausgesetzt waren erhöht, gegenüber infizierten normothermen Ratten. Vor der Interimsanalyse zeigte sich erwartungsgemäß nur ein Trend (siehe Abb. 3.2), bei endgültiger Gruppengröße von  $n = 42$  war dieser Unterschied dann statistisch signifikant (siehe Abb. 3.3). Somit erweist sich in der vorliegenden Studie präoperative milde Hypothermie als Risikofaktor für ein verschlechtertes postoperatives Sepsisoutcome.

Bei Betrachtung der in diesem Versuch gemessenen Zytokine, stellt man fest, dass die eine Stunde vor Infektion gemessenen Werte für IL-10, IL-6 und MIP-2 sich nicht zwischen den Gruppen unterscheiden (siehe Abb. 3.5 – 3.7). Dies war durchaus erwartet, da sich zum Blutabnahmezeitpunkt die Gruppen noch nicht voneinander unterschieden. Die Unterkühlung wurde erst nach der Blutabnahme induziert. Bei Betrachtung der postinfektiösen Werte allerdings fällt auf, dass die präoperative Hypothermie zu einer signifikant erhöhten Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 führte (siehe Abb. 3.5), sowie zu einer Reduktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 (siehe Abb. 3.7). Hieraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass schon eine Stunde milde Hypothermie zu einer Veränderung des Immunstatus in Richtung einer supprimierten Immunantwort führt.<sup>131</sup> Durch eine Störung der mehrfach in der Literatur beschriebenen empfindlichen Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Verlauf der Sepsis,<sup>183</sup> bewirkt präoperative milde Hypothermie somit möglicherweise eine Verschlechterung des Sepsisüberlebens. In mehreren Publikationen wird die Vermutung geäußert, ein Überwiegen der anti-inflammatorischen Reaktion zu Beginn der Sepsis bzw. ein Persistenz selbiger, sei ein Indikator für ein schlechtes Outcome.<sup>131;132</sup> Es wurde gezeigt, dass eine hohe Konzentration von IL-10 in den Anfangsstadien der Sepsis mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist.<sup>132</sup>

Eine Anzahl an Studien berichteten über eine Suppression von pro-inflammatorischen Zytokinen und eine gesteigerte Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen unter dem Einfluss von Hypothermie. So wurde von Kimura et al. eine reduzierte bzw. verspätete Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 in einer *in-vitro*-Kultur von mononukleären Zellen bei 33°C beobachtet.<sup>100</sup> Matsuoka et al. fanden eine reduzierte Expression der selben Zytokine bei Ratten mit Pankreatitis bei 32°C im Vergleich zu

normothermen Tieren.<sup>119</sup> Zwei weitere Studien stimmten in der Beobachtung überein, dass Hypothermie die Freisetzung von IL-10 in der Lunge steigert und die Freisetzung von IL-6 und IL-1 hingegen herabsetzt.<sup>109;164</sup>

Diese aufgeführten Beobachtungen unterstützen die Interpretation der vorliegenden Daten als eine Verschlechterung des Sepsisoutcomes durch präoperative Hypothermie, aufgrund einer Störung der Zytokinbalance in Richtung Immunsuppression.

Bei Betrachtung der Messwerte für Leukozyten und neutrophile Granulozyten (PMNs) im peripheren Blut vor und nach Infektion fällt auf, dass es eine Stunde nach durchgeführter abdomineller Kontamination zu einem statistisch signifikanten Abfall der Gesamt-Leukozyten in beiden Gruppen kam (siehe Abb. 3.4). Im Gegenzug war ein signifikanter Anstieg der PMNs in beiden Gruppen nach Infektion zu beobachten. Die Konstellation von Leukozytopenie und Granulozytose innerhalb der ersten Stunde nach peritonealer Infektion, wurde schon in früheren Studien beobachtet.<sup>97</sup> Es wurde berichtet, dass primär Lymphozyten und Monozyten für den Abfall der Gesamt-Leukozyten im peripheren Blut verantwortlich seien. Es wurde in derselben Studie beobachtet, dass es nach zwei Tagen zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Leukozytenzahl kam. Bezüglich dieser Aussage kann mit vorliegender Studie kein Vergleich gezogen werden, da nach Ablauf der ersten postoperativen Stunde keine weiteren Blutabnahmen erfolgten. Es ist anzunehmen, dass die Leukozytopenie im peripheren Blut innerhalb der ersten Stunde nach Infektion auf ein Auswandern von Lymphozyten und Monozyten in das Peritoneum zurückzuführen ist. Der Anstieg der PMNs ist wahrscheinlich durch eine entzündungsbedingte Rekrutierung selbiger zu erklären.

Im Vergleich von sowohl Gesamt-Leukozyten als auch PMNs zwischen beiden Gruppen, lässt sich kein statistischer Zusammenhang erkennen (siehe Abb. 3.4). Allenthalben lassen sich nicht signifikante Trends ausmachen. So fällt in der hypothermen Gruppe sowohl der Abfall der Leukozyten nach Infektion, als auch der Anstieg der PMNs geringer als in der normothermen Gruppe aus. Dieser Sachverhalt, wenn auch nicht statistisch signifikant, lässt sich gut durch die von anderen Autoren beschriebenen Nebenwirkungen der Hypothermie erklären: Hypothermie reduziert die

Anzahl zirkulierender Granulozyten, behindert die Rekrutierung selbiger und verlangsamt das Auswandern von Entzündungszellen zum Entzündungsherd.<sup>29-31</sup> Diese Mechanismen haben möglicherweise Anteil an der beobachteten Verschlechterung des Überlebens in der präoperativ hypothermen Gruppe. Weitere Erklärungen für den negativen Effekt der Hypothermie in dieser Studie, könnten die an anderer Stelle beschriebene hypothermiebedingte Reduzierung von Sauerstoffradikalen sein,<sup>102</sup> sowie die behinderte phagozytische Aktivität von peritonealen Monozyten und Makrophagen unter Hypothermie.<sup>163</sup>

#### **4.3.2 Der Einfluss von postoperativer Hypothermie und zusätzlich appliziertem G-CSF auf die Überlebensrate, Differentialblutbild, Zytokinausschüttung und Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten**

In dieser Versuchsreihe wurde im Gegensatz zu der Vorhergehenden (siehe 4.3.1) der Einfluss von postoperativer Hypothermie auf den perioperativen Sepsisverlauf untersucht. Wie in der ersten Versuchsreihe gezeigt wurde, hat präoperative Unterkühlung einen negativen Einfluss auf das postoperative Sepsisoutcome. Es wurde außerdem gezeigt, dass dies wahrscheinlich in einer Störung der sehr empfindlichen Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen begründet ist.<sup>183</sup> Dies legt die Vermutung nahe, dass Hypothermie möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen zeigt, je nach dem Zeitpunkt, an dem sie innerhalb des septischen Geschehens auftritt. Um dies zu untersuchen, wurde die hypotherme Phase unmittelbar nach Infektion, anstelle davor, durchgeführt. Dieses Design entspricht am ehesten einer postoperativen Unterkühlung, wie weiter oben erläutert.

Es wurden zwei separate Versuche zur postoperativen Hypothermie durchgeführt. Im ersten Versuch mit niedriger Komplexizität wurde keine Antibiotikaprophylaxe durchgeführt; im zweiten Versuch mit hoher Komplexizität erhielten alle Ratten eine Antibiose in klinisch üblicher Dosierung. Um auch im Versuch ohne Antibiotikaprophylaxe eine 30 – 50%ige Mortalität in der Kontrollgruppe zu erzielen, wurde nur die Hälfte der Stuhldosis appliziert. In der Tat gelang es, in beiden Versuchen eine Mortalität in den Kontrollgruppen von 50% zu erzielen (siehe Abb.

3.8 und 3.9). Hingegen überlebten in den Hypothermiegruppen nur 10% im Versuch mit niedriger Komplexizität und 20% im Versuch mit höherer Komplexizität. Dieser Zusammenhang ist in beiden Versuchen statistisch signifikant (siehe Abb. 3.8 und 3.9). Wie im Versuch mit präoperativer Hypothermie, zeigt auch postoperative Hypothermie einen signifikant negativen Einfluss auf das Sepsisüberleben. Das bedeutet, dass sowohl Unterkühlung vor, als auch Unterkühlung nach der Operation bzw. Infektion, als Risikofaktor anzusehen ist und nach Möglichkeit vermieden werden sollte.

Bei Betrachtung der gemessenen Zytokinwerte stellt sich allerdings die Frage, ob die negativen Auswirkungen dieser beiden Formen von Unterkühlung möglicherweise in unterschiedlichen Mechanismen begründet sind. Zwar sind die TNF- $\alpha$  Spiegel in allen Gruppen gleich, die gemessenen Werte für IL-6 und MIP-2 unterscheiden sich aber signifikant. So weist die unterkühlte Gruppe ein 3,5fach erhöhtes MIP-2 auf im Vergleich zur normothermen Gruppe. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 ist sogar fünffach erhöht bei den hypothermen Ratten. Insbesondere das erhöhte IL-6 legt den Schluss nahe, dass es sich hier um einen Zustand der Hyperinflammation handelt. Im vorherigen Versuch wurde aufgrund der Zytokinwerte die Schlussfolgerung gezogen, dass präoperative Hypothermie die empfindliche Balance der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine in Richtung Immunsuppression bewegt.<sup>183</sup> In Anlehnung daran legen die vorliegenden Daten dieses Versuches nahe, dass auch postoperative Hypothermie die Zytokinbalance stört. Nur in diesem Falle kommt es nicht zu einer verringerten Immunantwort, sondern zu einem Zustand der Hyperinflammation. Das Ergebnis in Bezug auf das perioperative Sepsisoutcome ist das gleiche, es kommt zu einer Verschlechterung. Dies ist wenig überraschend, da aus anderen Studien bekannt ist, dass sowohl eine Störung der Zytokinbalance in der Anfangsphase der Sepsis in Richtung der pro-inflammatorischen Reaktion, sowie in Richtung der anti-inflammatorischen Reaktion, eine Verschlechterung des Überlebens nach sich zieht.<sup>183</sup>

Während eine supprimierte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Hypothermie -wie im vorigen Versuch beobachtet- eine in der Literatur häufig beschriebene Beobachtung ist,<sup>100;109;119;164</sup> findet man nur wenige Daten über eine gesteigerte Expression selbiger bei Unterkühlung. Lediglich ein publizierter

Fallbericht von zwei Patienten mit akzidentieller Unterkühlung, beschreibt gesteigerte IL-6 Spiegel.<sup>4</sup> Dieser Bericht und die vorliegenden Daten legen den Schluss nahe, dass der Effekt von Unterkühlung auf den Organismus mit dem Zeitpunkt des Auftretens variiert.

Außer einer reinen Hypothermiegruppe, wurde in diesem Versuch eine hypotherme Gruppe mit zusätzlicher G-CSF Applikation geführt. Es ist aus vorherigen Versuchen anhand des CMRT Modells bekannt, dass eine G-CSF Prophylaxe vor der Induktion einer Sepsis zu einer Verbesserung des Überlebens von normothermen Ratten führt.<sup>110</sup>

Weiterhin wurde in früheren Versuchen die optimale Dosierung von G-CSF erforscht, sowie die optimalen Applikationszeitpunkte im perioperativen Verlauf.<sup>18</sup> Auf diesen Erkenntnissen beruht die in dieser Studie verwendete G-CSF Dosis sowie die Applikationszeitpunkte. Es ist zu beachten, dass in Tieren etwa die zehnfache Dosis im Vergleich zum Menschen notwendig ist, um eine Immunstimulation zu erzielen.<sup>18</sup>

Bei Betrachtung der Mortalität in dieser Gruppe stellt man fest, dass der negative Effekt der Unterkühlung durch G-CSF vollständig aufgehoben wurde (siehe Abb. 3.9); dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant. Genau betrachtet, ist das Überleben in der hypothermen G-CSF Gruppe sogar größer als das in der normothermen Gruppe. Allerdings ist dies nicht signifikant, so dass hier nur die Aussage getroffen werden kann, dass die perioperative Applikation von G-CSF die erhöhte Mortalität unter Hypothermie verhindert.

Eine mögliche Erklärung für den Mechanismus dieses G-CSF Effektes kann wiederum in der Zytokinanalyse gefunden werden. Der stark erhöhte IL-6 Spiegel in der Hypothermie Gruppe, ist unter Einfluss von G-CSF signifikant auf etwa die Hälfte reduziert (siehe Abb. 3.12). Ebenso ist der erhöhte MIP-2 Spiegel unter G-CSF abgemildert. Diese Beobachtung legt die Interpretation nahe, dass der vorteilhafte Effekt von G-CSF bei hypothermen Ratten zumindest teilweise durch eine Normalisierung der durch Unterkühlung gestörten Zytokinbalance zu erklären ist. Diese These wird durch die Erkenntnis vieler Studien unterstützt, dass G-CSF im Stande ist, die systemische Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen zu drosseln.<sup>14;17;37;49;79;87;110</sup> Nicht nur die systemische, sondern auch die lokale Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine am Entzündungsherd, wie hier dem Peritoneum, wird durch G-CSF reduziert.<sup>19</sup>

Weitere bekannte Wirkungen des G-CSFs können mögliche Erklärungen sein, für den in dieser Studie beobachteten positiven Effekt auf das Überleben bei Hypothermie. So bewirkt G-CSF unter anderem eine temporäre Erhöhung der Zahl der Leukozyten, insbesondere der neurophilen Granulozyten, im peripheren Blut. Dies geschieht durch eine Verminderung der Reifungszeit im Knochenmark und durch die Freisetzung von PMNs aus Speicherpools.<sup>17;94</sup> Diesen Effekt kann man in vorliegender Studie sehr gut am erstellten Blutbild ablesen (siehe Abb. 3.10). In der mit G-CSF vorbehandelten Gruppe sind sowohl die Gesamt-Leukozyten, als auch PMNs vor Operation signifikant gegenüber den anderen Gruppen erhöht.

Bei weiterer Betrachtung des Blutbildes ergibt sich ein sehr ähnliches Bild wie im vorherigen Versuch mit präoperativer Hypothermie. Innerhalb der ersten Stunde nach Infektion kommt es in allen Gruppen zu einem Abfall der zirkulierenden Gesamt-Leukozyten. Dies ist, wie schon zuvor beschrieben, mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein Auswandern von Lymphozyten und Monozyten zum Infektionsherd zurückzuführen.<sup>97</sup> Genau wie im vorherigen Versuch kommt es auch hier zu einem geringeren Abfall der Leukozyten in der gekühlten Gruppe. Allerdings stellt sich dieser Zusammenhang hier erstmals als statistisch signifikant dar. Die Erklärung könnte wieder die gebremste Auswanderung von Entzündungszellen unter Hypothermie sein.<sup>29-31</sup> Den vergleichsweise stärkeren Abfall der Leukozyten in der G-CSF Gruppe trotz vorliegender Hypothermie, kann man möglicherweise mit der Fähigkeit von G-CSF, die Migration der Granulozyten zu steigern, erklären.<sup>17;94</sup>

Bei Betrachtung der PMNs fällt auf, dass es in den beiden nicht mit G-CSF behandelten Gruppen zu einem Anstieg innerhalb der ersten Stunde nach Infektion kommt. Dies ist wiederum dem Versuch mit präoperativer Hypothermie sehr ähnlich. Wahrscheinlich ist dies in der gesteigerten Rekrutierung von PMNs als Reaktion auf die Infektion begründet. In der hypothermen Gruppe ist der Anstieg der PMNs etwas ausgeprägter als in der normothermen Gruppe, wenn auch nicht signifikant. Die Erklärung hierfür ist möglicherweise in der gesteigerten MIP-2 Expression in dieser Gruppe zu suchen. So steigert MIP-2 nämlich die Rekrutierung von PMNs.<sup>94</sup> Der gleiche Mechanismus kann den beobachteten Abfall der PMNs in der G-CSF Gruppe nach Infektion erklären (siehe Abb. 3.10). So wurde ja eine signifikante Reduzierung des MIP-2 Levels beobachtet, wenn postoperative Hypothermie mit einer G-CSF Prophylaxe kombiniert wurde (siehe Abb. 3.12).

Eine besonders wichtige Wirkung des G-CSFs, die möglicherweise Anteil am positiven Effekt in dieser Studie hat, ist eine Steigerung der antimikrobiellen Funktion von neutrophilen Granulozyten. So ist bekannt, dass es unter G-CSF zu einer Erhöhung der Migrations- und Phagozytoserate kommt, sowie zu einer gesteigerten Bildung von Sauerstoffradikalen.<sup>16,96</sup> Dies ist gerade im Zusammenhang mit Hypothermie sehr wichtig, da man weiß, dass Unterkühlung die phagozytische sowie chemotaktische Aktivität der Granulozyten hemmt.<sup>29-31</sup> Darüber hinaus ist unter Hypothermie die Produktion von Sauerstoffradikalen gehemmt.<sup>102</sup>

Um die Wirkung von G-CSF auf die Phagozytoserate unter Hypothermie zu explorieren, wurde im vorliegenden Versuch die Phagozytoserate der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten in allen drei Gruppen nach erfolgter Kontamination und Infektion gemessen (siehe Abb. 3.11). Es zeigten sich dabei sehr ähnliche Werte in allen Gruppen. Weder bei den PMNs, noch bei den Monozyten ergab sich ein signifikanter Unterschied. Somit kann der förderliche Einfluss von G-CSF auf die Phagozytoserate von neutrophilen Granulozyten in der vorliegenden Studie mit postoperativer Hypothermie nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Zustand ist, dass in der vorliegenden Studie eine ausreichend hohe G-CSF Dosis verwendet wurde, um die Anzahl an PMNs und deren Rekrutierung signifikant zu steigern, die Dosis jedoch nicht ausreichte, um die Phagozytoserate unter Hypothermie zu verbessern. Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die verschiedenen Effekte von G-CSF in hierarchischer Weise konzentrationsabhängig sind.<sup>87</sup> So bedarf es nur einer niedrigen G-CSF Konzentration, um die Apoptose der Granulozyten zu hemmen, aber einer hohen Konzentration, um hämatopoetische Stammzellen zu stimulieren und anti-inflammatorische Effekte zu induzieren.<sup>87</sup> Weiterhin wird die These durch eine Studie von Ishikawa et al. untermauert, in der G-CSF Patienten mit schweren Kopfverletzungen und induzierter milder Hypothermie verabreicht wurde.<sup>95</sup> Es zeigten sich positive immunologische Effekte, und es wurde demonstriert, dass G-CSF die Phagozytoseaktivität von Granulozyten unter Hypothermie signifikant steigert.



### 4.3.3 Perioperative Hypothermie als Risikofaktor?

In Zusammenfassung beider in vorliegender Dissertation durchgeführten Versuchreihen zum Einfluss prä- und postoperativer milder Hypothermie auf das postoperative Sepsisoutcome, kann man sagen, dass perioperative Hypothermie sich signifikant negativ auf die Mortalitätsrate auswirkt. Sowohl eine Induzierung der Unterkühlung vor, als auch nach der Laparotomie, führt zu einer Reduzierung des Überlebens. Damit muss man Hypothermie als perioperativen Risikofaktor annehmen. Offenbar scheinen sich allerdings die Mechanismen zu unterscheiden, die für prä- und postoperative Hypothermie zu diesem Ergebnis führen. Präoperativ induzierte Unterkühlung führt zu einer Immunsuppression, postoperativ induzierte Hypothermie hingegen zu einer Hyperinflammation. Dabei ist die Auswirkung auf die Mortalität die gleiche.

Selbstverständlich lassen sich diese Ergebnisse aus Tierversuchen nicht Eins zu Eins auf den Menschen übertragen. Aufgrund der klinischen Nähe des gewählten Modells, haben diese Ergebnisse dennoch Bedeutung für den klinischen Alltag.<sup>114</sup> Sie unterstützen die Empfehlung, bei jedem Patienten, insbesondere Patienten die sich kolonchirurgischen Eingriffen unterziehen, die perioperative Normothermie zu erhalten.<sup>83;114</sup> Weiterhin sollte in klinischen Studien zu neuen Sepsistherapien Hypothermie sorgfältig ausgeschlossen werden, da diese als Risikofaktor mit dem Ergebnis interferieren könnte.

In Fällen, in denen eine induzierte Hypothermie sich als eindeutig vorteilhaft erwiesen hat, dies ist zur Zeit nur beim Zustand nach Reanimation der Fall,<sup>136</sup> könnte eine G-CSF Prophylaxe eine Möglichkeit bieten, die gestörte Immunreaktion des Patienten auf eine bakterielle Peritonitis zu verbessern. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen diese These. Es bedarf nun randomisierter klinischer Studien, bevor eine klinische Empfehlung diesbezüglich ausgesprochen werden kann.

Neben den unter 4.1 erläuterten Limitierungen des Tiermodells selber, ist eine weitere Limitierung in Bezug auf die Hypothermie zu erwähnen. Viele Tiere, darunter Ratten, Hasen und Schweine, haben eine höhere Körpertemperatur als Menschen. Daher stellt die gewählte milde Hypothermie von 32°C bei Ratten eine profundere Unterkühlung dar, als beim Menschen.<sup>148</sup> Dies schränkt daher die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Studie auf den Menschen ein.

## 4.4 Versuchsreihe zur Unterernährung

Unterernährung ist ein sehr häufiges klinisches Problem. Die Prävalenz in hospitalisierten Patienten wird auf 20 – 60% geschätzt,<sup>55;56;203</sup> bei älteren Menschen auf über 50%.<sup>47</sup>

In der Literatur ist Unterernährung eindeutig als unabhängiger Risikofaktor für Morbidität und Mortalität identifiziert.<sup>126;137</sup> Darüber hinaus weiß man heute, dass Unterernährung zahlreiche negative Auswirkungen auf das Immunsystem hat. So behindert sie die Immunität des Organismus auf zellulärer wie humoraler Ebene.<sup>99</sup>

Trotz aller bewiesenen negativen Effekte der Unterernährung, insbesondere auf die Infektabwehr, herrscht Uneinigkeit über die Bedeutung als perioperativer Risikofaktor.<sup>198</sup>

### 4.4.1 Versuch 1: Vorversuch zur Erprobung der Entwicklung chronischer Unterernährung

In der vorliegenden Studie sollte der Effekt von chronischer Unterernährung auf das postoperative Sepsisoutcome untersucht werden. Dazu war es notwendig, eine chronische Unterernährung in einem Teil der Ratten zu induzieren. Um eine einfache Durchführbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde ein einfacher Nahrungsentzug von 50% über einen Zeitraum von drei Wochen gewählt.<sup>150</sup> Es wurde orientierend an der Methodik zweier publizierter Studien vorgegangen,<sup>78;145</sup> und es sollten die in diesen Studien dargestellten Unterernährungsverläufe mit einem Vorversuch mit kleiner Gruppengröße (n = 5) verglichen werden, um die Reproduzierbarkeit der Methodik sicherzustellen.

Diesen beiden Studien ist zu entnehmen, dass bei den normal ernährten Tieren eine etwa lineare Gewichtszunahme zu erwarten ist. Im Gegenzug ist bei Tieren, denen 50% der normalen Nahrungsmenge vorenthalten wird, eine gewisse Stagnation im Wachstum zu erwarten. Weiterhin ist ausgehend vom Ausgangsgewicht der Ratten im Vorversuch, bei einem dreiwöchigen 50%igen Nahrungsentzug, ein zu entwickelnder Gewichtsunterschied von etwa 100 Gramm zu erwarten.<sup>78;145</sup> In der Tat ließen sich diese Beobachtungen sehr gut reproduzieren (siehe Abb. 3.13 und 3.14). In Abb. 3.13

erkennt man eine annähernd lineare Gewichtszunahme der normal ernährten Tiere, sowie eine Gewichtsstagnation in der unterernährten Gruppe. Mehrere Studien unterstützen diese Beobachtung: ein Nahrungsentzug von 30 – 50% verhindert das normale Wachstum junger Ratten.<sup>58;81;145</sup> Am Ende der dreiwöchigen Unterernährungsphase lag ein durchschnittlicher Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen von knapp über 80 Gramm vor (siehe Abb. 3.13). Dieses entspricht sehr gut den erwarteten 100 Gramm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gewählte Methodik auf reproduzierbare Weise eine Unterernährung bei Ratten induziert.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass ein einfacher Nahrungsentzug nicht ohne weiteres mit einer echten Malnutrition gleichgesetzt werden kann. Unter dem Terminus Malnutrition wird üblicherweise eine Protein-Kalorien-Unterernährung verstanden, also ein Mangel an nicht nur Kalorien, sondern auch Protein und weiteren wichtigen Nahrungsbestandteilen. Es wurde berichtet, dass man in Labortieren einen 20 – 50%igen Nahrungsentzug mit normalem, nicht purifiziertem Laborfutter, wie dem in dieser Studie verwendeten CE-2 (CLEA Japan), durchführen kann, ohne eine signifikante Malnutrition zu induzieren.<sup>150</sup> Auf der anderen Seite allerdings, wurde berichtet, dass schon ein Nahrungsentzug (ansteigend von 15 – 65%) über 35 Tage eine gestörte inflammatorische Reaktion bei Endotoxinämie bewirkt.<sup>75</sup> Daraus wurde für diese Studie geschlossen, dass ein Nahrungsentzug von konstant 50% über drei Wochen nicht mit einer Protein-Malnutrition, wie beispielsweise bei Kindern der dritten Welt vorherrschend, gleichgesetzt werden kann, aber dennoch dem Immunsystem ein ausreichend großer Schaden zugefügt wird, um die Fragestellung zu bearbeiten. Darüber hinaus entspricht ein einfacher Kalorienentzug wahrscheinlich eher der Art von Unterernährung, die man bei älteren Menschen in westlichen Industrienationen im präoperativen Umfeld antrifft.<sup>39</sup>

#### 4.4.2 Versuch 2: Einfluss chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung ; gleiches Alter der Tiere beider Gruppen bei ACI

Die im Vorversuch erprobte Methodik zur Entwicklung von Unterernährung wurde analog in einem Versuch mit einer größeren Anzahl an Tieren ( $n = 30$ ) angewendet. Nach durchgeführter Kontamination und Infektion wurde eine Überlebensrate von 37% in der normal ernährten Gruppe beobachtet, hingegen überlebten 67% aller unterernährten Tiere (siehe Abb. 3.15). Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick sehr überraschend und entspricht in keiner Weise den im Vorfeld getätigten Überlegungen. Das Ergebnis suggeriert einen protektiven Effekt von Unterernährung. In der Tat ist chronischer Nahrungsentzug das bisher einzige Verfahren, dass bei Versuchstieren das Altern verlangsamt, das Leben verlängert und die Inzidenz von malignen Erkrankungen herabsetzt.<sup>150</sup> Allerdings erklärt dies sicher nicht den hier beobachteten „protektiven“ Effekt der Unternährung im septischen Umfeld, insbesondere da man weiß, dass Unterernährung die Immunreaktion negativ beeinflusst.<sup>75</sup>

Bei näherer Betrachtung findet sich aber eine recht einfache und eindeutige Erklärung, für die überraschenden Überlebensraten: In einer Studie von Kuzlan et al. wurde herausgefunden, dass die peritoneale Oberfläche von Ratten nicht proportional zum Körpergewicht wächst.<sup>104</sup> Demnach haben jüngere Ratten mit entsprechend niedrigerem Körpergewicht, eine relativ größere peritoneale Oberfläche, als ältere, größere Ratten.<sup>104</sup> Da die in vorliegendem Versuch unterernährten Ratten in ihrer Gewichtsentwicklung stagnierten und somit nur fast halb so schwer waren wie die Kontrolltiere, kann man schlussfolgern, dass die unterernährten Ratten eine in Relation zum Körpergewicht größere peritoneale Oberfläche hatten, als die Kontrolltiere. Das verabreichte Stuhlvolumen wurde aber in beiden Gruppen anhand der gleichen Formel berechnet und somit vom Körpergewicht allein abhängig gemacht. Dies bedeutet, dass bei den normal ernährten, schwereren Kontrolltieren pro peritonealer Oberflächeneinheit mehr Stuhlkeime verabreicht wurde. Das Verteilungsvolumen ist also kleiner. Somit wurde bei den normalgewichtigen Tieren ungewollt eine schwerere Infektion induziert, als bei den unterernährten Ratten. Dies erklärt die auf den ersten Blick überraschende Mortalitätssenkung unter Nahrungsentzug.

Diese These wird durch die Zytokinmessung unterstützt: Alle drei gemessenen Zytokine (TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-6) sind in der Kontrollgruppe eine Stunde nach Infektion erniedrigt (siehe Abb. 3.16). Die relativ stärkere Infektion in dieser Gruppe hat das Immunsystem überfordert. Man weiß, dass sich eine Immunsuppression in der frühen Phase der Sepsis negativ auf das Überleben auswirkt.<sup>131;132;195</sup>

Zwar wurde in vorliegender, sowie in zahlreichen früheren Studien,<sup>20;110</sup> eine Stuhl-Dosis-Wirkungskurve erstellt (siehe 4.2), um den Effekt von verschiedenen Stuhlvolumina auf die Mortalität zu untersuchen, jedoch wurden dazu immer Ratten mit einheitlichem Körpergewicht verwendet. Daher ist ein unterschiedlicher Effekt von gleichen Stuhlvolumina bei unterschiedlich schweren Tieren nicht aufgefallen. Basierend auf den Beobachtungen dieser Studie, bedarf es einer Objektivierung dieses Zusammenhangs in weiteren Tierstudien. Auf diese Weise könnte man in zukünftigen Versuchen mit dem CMRT Modell die Stuhldosis besser an das tatsächliche Gewicht der Ratten anpassen und die Reproduzier- und Interpretierbarkeit der Ergebnisse noch weiter verbessern.

#### **4.4.3 Versuch 3: Einfluss von chronischer Unterernährung auf die Überlebensrate und Zytokinfreisetzung; gleiches Gewicht der Tiere beider Gruppen bei ACI**

Um die in Versuch 2 aufgetretenen Problematik bezüglich des unterschiedlichen Gewichts der Ratten am Operationstag zu eliminieren, wurde in diesem Versuch einer Gruppe von Ratten über den Zeitraum von drei Wochen 50% der Nahrung entzogen. Die Gruppe von Kontrolltieren wurde erst kurz vor dem Operationszeitpunkt geliefert, mit einem an die unterernährte Gruppe angepassten durchschnittlichen Gewicht. Somit bestand zwar ein Altersunterschied zwischen den Gruppen von etwa 3 Wochen, aber eine Induktion von gleich schweren Infektionen in beiden Gruppen war auf diese Art und Weise gewährleistet.

Anders als im vorhergehenden Versuch wurde in beiden Gruppen eine Mortalität von 50% beobachtet (siehe Abb. 3.17). Das bedeutet, dass es durch die Umstellung der

Methodik gelang, den positiven Effekt des niedrigeren Gewichtes in Gruppe B aufzuheben. Es sollte nun möglich sein, den eigentlichen Effekt der Unterernährung auf den septischen Verlauf zu erkennen. Die Beobachtung identischer Überlebensraten in beiden Gruppen legt die Schlussfolgerung nahe, dass ein 50%iger Nahrungsentzug über drei Wochen keinen Einfluss auf das Überleben bei postoperativer Sepsis in diesem Tiermodell hat. Zumindest ist dieser Effekt so gering, dass er im simulierten komplexen klinischen Umfeld keine ausreichend große Bedeutung trägt.

Bei Betrachtung der eine Stunde nach durchgeführter Infektion gemessenen Zytokinwerte fällt auf, dass die Expression für sowohl TNF- $\alpha$ , als auch MIP-2 und IL-6 in der unterernährten Gruppe geringer ausfällt, als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.18). Dies sind jedoch nur Trends; statistische Signifikanzen lassen sich nicht errechnen. Dennoch fügt sich diese Beobachtung sehr gut in den aktuellen Wissenstand der Forschung ein: Viele Studien haben eine Reduktion der Zytokinexpression bei Malnutrition bzw. Unterernährung<sup>28;40;54;121</sup> und bei einfachem Nahrungsentzug beschrieben.<sup>75</sup> Nach bestem Wissen des Autors ist nie eine gesteigerte Ausschüttung von Zytokinen aufgrund von Unterernährung berichtet worden.

#### 4.4.4 Präoperative Unterernährung als Risikofaktor?

Es kann als gesichert angesehen werden, dass Unterernährung das Immunsystem negativ beeinflusst.<sup>168</sup> Dies geschieht auf zellulärer wie humoraler Ebene. So schränkt Unterernährung die Funktion des Thymus ein und führt zu einer gestörten Reifung der T-Lymphozyten.<sup>99</sup> Dies führt zu einer Reduktion in der Anzahl Antikörper produzierender Zellen. Die Funktion der neutrophilen Granulozyten wird auf verschiedene Weise eingeschränkt.<sup>168</sup> Weiterhin ist bei Unterernährung die Expression unter anderem der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  reduziert.<sup>28;40;54;75;121</sup> Diese Beobachtung wird durch die vorliegende Studie unterstützt, wenn auch statistisch nicht signifikant. Es ist also durchaus möglich, dass auch in dieser Studie der dreiwöchige Nahrungsentzug einen negativen Effekt auf das Immunsystem gehabt hat.

Durchaus kontrovers wird die Bedeutung dieser negativen Effekte für den perioperativen Verlauf diskutiert. Es wurde von einer 90%igen Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes, sowie einer Häufung der perioperativen Komplikationen um das Dreifache berichtet.<sup>72</sup> An anderer Stelle jedoch wird die Bedeutung von Unterernährung als perioperativer Risikofaktor durchaus angezweifelt.<sup>151;198</sup> Laut den Autoren dieser beiden Publikationen ist es zweifelhaft, ob Unterernährung im komplexen perioperativen Umfeld großes Gewicht trägt. Neben weitaus schwerer wiegenden perioperativen Faktoren wie den Fähigkeiten des Chirurgen, oder einer geeigneten Antibiotikaphylaxe, sei es schwierig Unterernährung klar als Risikofaktor abzugrenzen.<sup>198</sup> Diese Auffassung wird durch die vorliegende Studie bestätigt. Eine der Hauptzielsetzungen des gewählten CMRT Modells ist die Simulation der klinischen Komplexität, inklusive Antibiotikaphylaxe und chirurgischer Intervention (siehe 4.1). Möglicherweise hätte man in vorliegender Studie eine höhere Mortalität in der unterernährten Gruppe erkennen können, wenn der Versuch in niedrigerer, realitätsfernerer Komplexität durchgeführt worden wäre. Im Umfeld zahlreicher klinischer Faktoren und Interventionen jedoch, kann Unterernährung nicht als selbständiger Risikofaktor für ein verschlechtertes postoperatives Sepsisüberleben abgegrenzt werden. Dies stellt die Notwendigkeit einer präoperativen Korrektur von Unterernährungszuständen in Frage. Unter Umständen wiegt der Benefit einer frühzeitigen Operation schwerer, als der Benefit eines besseren Ernährungszustandes, insbesondere da zum Erreichen eines solchen die Operation verschoben werden müsste. Dies wird durch eine Studie untermauert, die herausfand, dass eine forcierte Ernährung im Krankenhaus zu spät komme, um signifikante Effekte zu zeigen.<sup>55</sup>

Trotz der hier diskutierten zweifelhaften Bedeutung von Unterernährung für das Sepsisoutcome ist Vorsicht geboten. Aufgrund des geringeren Körperfettanteils sind unterernährte Individuen besonders prädisponiert, eine perioperative Hypothermie zu entwickeln.<sup>113</sup> Wie im ersten Teil dieser Dissertation gezeigt wurde, hat perioperative Hypothermie sehr wohl negative Folgen für den septischen Verlauf.

## **5 Zusammenfassung**

Trotz erheblicher Fortschritte in der Intensivmedizin und Forschung, stellt das Krankheitsbild der Sepsis aufgrund stetig steigender Inzidenz und nur marginal zurückgehender Mortalität ein immer wichtiger werdendes Problem auf der Intensivstation dar. Insbesondere Patienten, die großen abdominalchirurgischen Eingriffen unterzogen werden, sind gefährdet eine postoperative Sepsis zu entwickeln, oft mit infauster Prognose. Da zurzeit eine kausale Therapie der Sepsis limitiert ist und die Mittel der Intensivmedizin begrenzt sind, erscheint es wichtig, Risikofaktoren für ein verschlechtertes Sepsisoutcome zu kennen. Dies gilt insbesondere dann, wenn diese modifizierbar sind. Auch für die Planung und Durchführung klinischer Studien ist die Kenntnis von Risikofaktoren wichtig, da ein Nichtbeachten dieser die Interpretierbarkeit der Ergebnisse einschränkt. In dieser Dissertation wurde die Bedeutung von perioperativer milder Hypothermie (32°C) und chronischer Unterernährung als Risikofaktoren für ein verschlechtertes postoperatives Sepsisüberleben evaluiert. Sowohl Unterkühlung, prä- und postoperativ, als auch Unterernährung lassen sich häufig bei chirurgischen Patienten im perioperativen Verlauf beobachten. Für beide Faktoren sind negative Effekte auf das Immunsystem beschrieben worden, die Bedeutung für den postoperativen Verlauf wird jedoch kontrovers diskutiert.

In dieser Dissertation wurde das CMRT Modell verwendet, bei dem unter Simulation klinischer Komplexität eine fäkale Peritonitis in Wistar-Ratten induziert wird. In zwei Versuchen wurde der Effekt von sowohl vor, als auch nach Operation induzierter milder Unterkühlung auf die 120-Stunden-Mortalität untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt von perioperativer G-CSF Prophylaxe bei Hypothermie studiert. In einer separaten Versuchsreihe wurde der Einfluss von 50%igem Nahrungsentzug über drei Wochen auf die postoperative Mortalität untersucht.

Sowohl bei prä-, als auch bei postoperativ induzierter Hypothermie zeigte sich ein signifikant verschlechtertes Überleben der Ratten. Bei zusätzlicher G-CSF Prophylaxe war die Mortalität wieder normalisiert und der normothermen Gruppe gleich. Im Versuch mit präoperativer Hypothermie zeigten die Zytokinmessungen eine verminderte Immunreaktion der unterkühlten Ratten, mit signifikant reduzierter IL-6 und signifikant gesteigerter IL-10 Expression. Im Versuch mit postoperativer



Hypothermie zeigte sich anhand einer signifikant gesteigerten IL-6 Expression ein hyperinflammatorischer Zustand der gekühlten Tiere. Unter zusätzlicher G-CSF Prophylaxe war dies in abgemilderter Form zu beobachten.

In der Versuchsreihe mit chronischem Nahrungsentzug zeigte sich eine Mortalitätsrate von 50% in beiden Gruppen. Die unterernährte Gruppe wies eine nicht signifikante Suppression der Zytokine TNF- $\alpha$ , MIP-2 und IL-6 auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass perioperative milde Hypothermie einen negativen Effekt auf das Überleben der postoperativen Sepsis hat, unabhängig davon, ob sie vor oder nach der Operation induziert wird. In beiden Fällen scheint dieser Effekt in einer Störung der empfindlichen Zytokinbalance in der frühen Phase der Sepsis begründet zu sein. Allerdings drängt präoperative Hypothermie diese Balance in Richtung Immunsuppression, postoperative Unterkühlung hingegen in Richtung Hyperinflammation. Aufgrund der klinischen Nähe des verwendeten Tiermodells, unterstützen diese Daten die Empfehlung, Patienten im perioperativen Umfeld normotherm zu halten. Sollte eine perioperative Hypothermie eindeutig indiziert sein, kann möglicherweise eine G-CSF Prophylaxe die negativen Auswirkungen der Kühlung auf das Immunsystem abmildern. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These. Klinische Studien sind nun erforderlich, um eine Empfehlung auszusprechen zu können.

Chronische Unterernährung zeigt trotz nachgewiesener negativer Auswirkungen auf das Immunsystem in dieser Arbeit keinen Effekt auf die postoperative Mortalität. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass Unterernährung im komplexen perioperativen Umfeld keine ausreichend große Bedeutung trägt und somit nicht als unabhängiger Risikofaktor identifiziert werden kann. Die vorliegende Arbeit untermauert damit die Forderung, eine notwendige operative Versorgung nicht aufgrund einer vorherrschenden Unterernährung aufzuschieben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Abraham E**, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, Glauser M, Parsons P, Fisher CJ, Jr., Repine JE: Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28: 232-5
2. **Abraham E**, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, .: Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995; 273: 934-41
3. **Aibiki M**: Practical aspects and prevention of complications during therapeutic hypothermia. *Intensive Care Med* 2004; 30: 2286
4. **Aibiki M**, Maekawa S, Nishiyama T, Seki K, Yokono S: Activated cytokine production in patients with accidental hypothermia. *Resuscitation* 1999; 41: 263-8
5. **Angus DC**, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-10
6. **Angus DC**, Wax RS: Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001; 29: S109-S116
7. **Annane D**, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B: Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 165-72
8. **Annane D**, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y: Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2004; 329: 480

9. **Anonym**: Patient notes: Understanding body mass index. *Postgrad Med* 2005; 117: 46
10. **Ball J**: What are the challenges of translating positive trial results in severe sepsis into clinical practice? A media roundtable debate, 18 March 2002, Brussels, Belgium. *Crit Care* 2002; 6: 271-4
11. **Barone JE**, Tucker JB, Cecere J, Yoon MY, Reinhard E, Blabey RG, Jr., Lowenfels AB: Hypothermia does not result in more complications after colon surgery. *Am Surg* 1999; 65: 356-9
12. **Barriere SL**, Lowry SF: An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 1995; 23: 376-93
13. **Bauhofer A**, Celik I, Plaul U, Torossian A: Effects of G-CSF and antibiotic prophylaxis in a 2x2 factorial design on outcome in septic rats. *Inflamm Res* 2004; 53 Suppl.2: S126-S129
14. **Bauhofer A**, Celik I, Lorenz W, Juvan R, Sitter H, Reimund K-P, and Greger B: The antibiotic regime has substantial influence on the positive effect of rhG-CSF in sepsis. *Shock suppl* 7, 78 (4<sup>th</sup> Worldcongress on trauma, shock, inflammation and sepsis, München). 1997
15. **Bauhofer A**, et al: Zur Publikation angenommen. *Ann Surg*. 2005
16. **Bauhofer A**, Huttel M, Reimund K-P, Celik I, Greger B, Lorenz W: Effective prophylaxis with rhG-CSF in abdominal sepsis: a new mechanism improving the antimicrobial functions of granulocytes (Wirksame Prophylaxe mit rhG-CSF bei abdomineller Sepsis: Verbesserung der antimikrobiellen Funktion von Granulozyten als neuer Mechanismus in vivo). *Langenbecks Arch Chir* 1997; 593-6
17. **Bauhofer A**, Lorenz W, Celik I, Stinner B, Solovera J, Lorijn R: Haematopoietic cytokines, G-CSF and abdominal surgery, *Cytokines and the abdominal surgeon*. Edited by Schein M, Wise L. Austin, Texas, Landes Bioscience, 1998, pp 117-41

18. **Bauhofer A**, Lorenz W, Stinner M, Rothmund M, Koller M, Sitter H, Celik I, Farndon JR, Fingerhut A, Hay J-M, Lefering R, Lorijn R, Nyström P-O, Schäfer H, Schein M, Solomkin J, Troidl H, Volk H-D, Wittmann DH, Wyatt J, Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF.: Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part two: design of the study. *Inflamm Res* 2001; 50: 187-205
19. **Bauhofer A**, Stinner B, Kohlert F, Reckzeh B, Lorenz W, Celik I: Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *Br J Surg* 2002; 89: 1457-63
20. **Bauhofer A**, Torossian A, Lorenz W, Middeke M, Plaul U, Schütz P, Stinner B, Huttel M, Celik I, Lucerne Study Group: Dependence of positive effects of granulocyte colony-stimulating factor on the antibiotic regime: evaluation in rats with polymicrobial peritonitis. *World J Surg* 2004; 28: 834-44
21. **Bauhofer A**, Witte K, Celik I, Pummer S, Lemmer B, Lorenz W: Sickness behavior, an animal equivalent to quality of life, is improved in septic rats by G-CSF and antibiotic prophylaxis. *Langenbecks Arch Chir* 2001; 386: 132-40
22. **Beilin B**, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H: Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology* 1998; 89: 1133-40
23. **Ben Eliyahu S**, Shakhar G, Rosenne E, Levinson Y, Beilin B: Hypothermia in barbiturate-anesthetized rats suppresses natural killer cell activity and compromises resistance to tumor metastasis: a role for adrenergic mechanisms. *Anesthesiology* 1999; 91: 732-40

24. **Bennett SP**, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL: Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 2003; 90: 133-46
25. **Bernard GR**, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344: 699-709
26. **Bernard GR**, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB: The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 912-8
27. **Bernard SA**, Buist M: Induced hypothermia in critical care medicine: A review. *Crit Care Med* 2003; 31: 2041-51
28. **Bhaskaram P**, Sivakumar B: Interleukin-1 in malnutrition. *Arch Dis Child* 1986; 61: 182-5
29. **Biggar WD**, Barker C, Bohn D, Kent G: Partial recovery of neutrophil functions during prolonged hypothermia in pigs. *J Appl Physiol* 1986; 60: 1186-9
30. **Biggar WD**, Bohn D, Kent G: Neutrophil circulation and release from bone marrow during hypothermia. *Infect Immun* 1983; 40: 708-12
31. **Biggar WD**, Bohn DJ, Kent G, Barker C, Hamilton G: Neutrophil migration in vitro and in vivo during hypothermia. *Infect Immun* 1984; 46: 857-9
32. **Bone RC**: A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *JAMA* 1991; 266: 1686-91
33. **Bone RC**, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine* 1987; 317: 653-8

34. **Boneberg E-M**, Hartung T: Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm Res* 2002; 51: 119-28
35. **Brun Buisson C**, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B: Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995; 274: 968-74
36. **Bühl A**, Zöfel P: SPSS for windows, release 10, 7 Edition. München, Boston, Addison-Wesley, 2000, pp 1-734
37. **Busch CJ**, Wanner GA, Menger MD, Vollmar B: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) reduces not only gram-negative but also gram-positive infection-associated proinflammatory cytokine release by interaction between Kupffer cells and leukocytes. *Inflamm Res* 2004; 53: 205-10
38. **Butterworth CE**: The skeleton in the hospital closet. 1974. *Nutrition* 1994; 10: 435-41
39. **Casper RC**: Nutrition and its relationship to aging. *Exp Gerontol* 1995; 30: 299-314
40. **Chandra RK**: 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1087-101
41. **Chandra RK**: Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14304-7
42. **Chopp M**, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KM: The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 141-8

43. **Clemmer TP**, Fisher CJ, Jr., Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO: Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 1992; 20: 1395-401
44. **Clifton GL**, Allen S, Barrodale P, Plenger P, Berry J, Koch S, Fletcher J, Hayes RL, Choi SC: A phase II study of moderate hypothermia in severe brain injury. *J Neurotrauma* 1993; 10: 263-71
45. **Clifton GL**, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR, Jr., Muizelaar JP, Wagner FC, Jr., Marion DW, Luerssen TG, Chesnut RM, Schwartz M: Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344: 556-63
46. **Coimbra C**, Wieloch T: Hypothermia ameliorates neuronal survival when induced 2 hours after ischaemia in the rat. *Acta Physiol Scand* 1992; 146: 543-4
47. **Constans T**: Malnutrition in the elderly. *Rev Prat* 2003; 53: 275-9
48. **Crogan NL**, Pasvogel A: The influence of protein-calorie malnutrition on quality of life in nursing homes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58: 159-64
49. **Dale DC**, Liles WC, Summer WR, Nelson S: Granulocyte colony-stimulating factor: role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995; 172: 1061-75
50. **Deans KJ**, Minneci PC, Banks SM, Natanson C, Eichacker PQ: Substantiating the concerns about recombinant human activated protein C use in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 2542-3
51. **Debets JM**, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ: Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med* 1989; 17: 489-94

52. **Deitch EA**: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Schock* 1998; 9: 1-11
53. **Dellinger RP**, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM: Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30: 536-55
54. **Doherty JF**, Golden MH, Remick DG, Griffin GE: Production of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in vitro is reduced in whole blood of severely malnourished children. *Clin Sci (Lond)* 1994; 86: 347-51
55. **Edington J**, Barnes R, Bryan F, Dupree E, Frost G, Hickson M, Lancaster J, Mongia S, Smith J, Torrance A, West R, Pang F, Coles SJ: A prospective randomised controlled trial of nutritional supplementation in malnourished elderly in the community: clinical and health economic outcomes. *Clin Nutr* 2004; 23: 195-204
56. **Edington J**, Boorman J, Durrant ER, Perkins A, Giffin CV, James R, Thomson JM, Oldroyd JC, Smith JC, Torrance AD, Blackshaw V, Green S, Hill CJ, Berry C, McKenzie C, Vicca N, Ward JE, Coles SJ: Prevalence of malnutrition on admission to four hospitals in England. The Malnutrition Prevalence Group. *Clin Nutr* 2000; 19: 191-5
57. **Emery PW**, Lovell L, Rennie MJ: Protein synthesis measured in vivo in muscle and liver of cachectic tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1984; 44: 2779-84
58. **Escriva F**, Rodriguez C, Cacho J, Alvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM: Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol* 1992; 263: E1-E7
59. **Eskandari MK**, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG: Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol* 1992; 148: 2724-30



60. **Esmon CT**: Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32: S219-S222
61. **Facon T**, Harousseau JL, Maloisel F, Attal M, Odriozola J, Alegre A, Schroyens W, Hulin C, Schots R, Marin P, Guilhot F, Granena A, De Waele M, Pigneux A, Meresse V, Clark P, Reiffers J: Stem cell factor in combination with filgrastim after chemotherapy improves peripheral blood progenitor cell yield and reduces apheresis requirements in multiple myeloma patients: a randomized, controlled trial. *Blood* 1999; 94: 1218-25
62. **Fairchild KD**, Singh IS, Patel S, Drysdale BE, Viscardi RM, Hester L, Lazusky HM, Hasday JD: Hypothermia prolongs activation of NF-kappaB and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C422-C431
63. **Fink MP**, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990; 49: 186-96
64. **Fisher CJ, Jr.**, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1996; 334: 1697-702
65. **Fisher CJ, Jr.**, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA: Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open- label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1994; 22: 12-21
66. **Flores-Maldonado A**, Medina-Escobedo CE, Rios-Rodriguez HM, Fernandez-Dominguez R: Mild perioperative hypothermia and the risk of wound infection. *Arch Med Res* 2001; 32: 227-31

67. **Frank SM**, Beattie C, Christopherson R, Norris EJ, Perler BA, Williams GM, Gottlieb SO: Unintentional hypothermia is associated with postoperative myocardial ischemia. The Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group. *Anesthesiology* 1993; 78: 468-76
68. **Frank SM**, Fleisher LA, Breslow MJ, Higgins MS, Olson KF, Kelly S, Beattie C: Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events. A randomized clinical trial. *JAMA* 1997; 277: 1127-34
69. **Frank SM**, Higgins MS, Breslow MJ, Fleisher LA, Gorman RB, Sitzmann JV, Raff H, Beattie C: The catecholamine, cortisol, and hemodynamic responses to mild perioperative hypothermia. A randomized clinical trial. *Anesthesiology* 1995; 82: 83-93
70. **Friedman G**, Silva E, Vincent JL: Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit care med* 1998; 26: 2078-86
71. **Friedman LM**, Furberg CD, DeMets DL: *Fundamentals of clinical trials*, 2nd Edition. Littleton, Massachusetts, PSG publishing Company Inc., 1985,
72. **Gallagher-Allred CR**, Voss AC, Finn SC, McCamish MA: Malnutrition and clinical outcomes: the case for medical nutrition therapy. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 361-6, 369
73. **Gao F**, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL: Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002; 105: 1497-502
74. **Gilston A**: Induced hypothermia for sepsis? *Crit Care Med* 1993; 21: 1247-8
75. **Giovambattista A**, Chisari AN, Corro L, Gaillard RC, Spinedi E: Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions and during the acute-phase response to endotoxic shock in undernourished rats. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7: 92-8

76. **Girard TD**, Opal SM, Ely EW: Insights into severe sepsis in older patients: from epidemiology to evidence-based management. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 719-27
77. **Gisselbrecht C**, Haioun C, Lepage E, Bastion Y, Tilly H, Bosly A, Dupriez B, Marit G, Herbrecht R, Deconinck E, Marolleau JP, Yver A, Dabouz-Harrouche F, Coiffier B, Reyes F: Placebo-controlled phase III study of lenograstim (glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: factors influencing chemotherapy administration. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Leuk Lymphoma* 1997; 25: 289-300
78. **Glass AR**, Young RA, Anderson J: Decreased serum 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) and abnormal serum binding of T3 in calorie-deficient rats: adaptation after chronic underfeeding. *Endocrinology* 1986; 118: 2464-9
79. **Goergen I**, Hartung T, Leist M, Niehoerster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A: Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor alpha. *J Immunol* 1994; 149: 918-24
80. **Gough A**, Clapperton M, Rolando N, Foster AVM, Philpott-Howard J, Edmonds ME: Randomised placebo controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 1997; 350: 855-9
81. **Grace CJ**, Swenne I, Kohn PG, Strain AJ, Milner RD: Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabete Metab* 1990; 16: 484-91
82. **Grimes CJ**, Younathan MT, Lee WC: The effect of preoperative total parenteral nutrition on surgery outcomes. *J Am Diet Assoc* 1987; 87: 1202-6
83. **Gropper MA**: Sepsis and hypothermia: call in the granulocytes? *Anesthesiology* 2003; 99: 1041-3

84. **Gubler KD**, Gentilello LM, Hassantash SA, Maier RV: The impact of hypothermia on dilutional coagulopathy. *J Trauma* 1994; 36: 847-51
85. **Gundersen Y**, Vaagenes P, Pharo A, Valo ET, Opstad PK: Moderate hypothermia blunts the inflammatory response and reduces organ injury after acute haemorrhage. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 994-1001
86. **Hartmann LC**, Tschetter LK, Habermann TM, Ebbert LP, Johnson PS, Mailliard JA, Levitt R, Suman VJ, Witzig TE, Wieand HS, Miller LL, Moertel CG: Granulocyte colony-stimulating factor in severe chemotherapy-induced afebrile neutropenia. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 1776-80
87. **Hartung T**, von Aulock S, Schneider C, Faist E: How to leverage an endogenous immune defense mechanism: the example of granulocyte colony-stimulating factor. *Crit Care Med* 2003; 31: S65-S75
88. **Healy DP**: New and emerging therapies for sepsis. *Annals Pharmacotherapy* 2002; 36: 648-54
89. **Herrmann FR**, Safran C, Levkoff SE, Minaker KL: Serum albumin level on admission as a predictor of death, length of stay, and readmission. *Arch Intern Med* 1992; 152: 125-30
90. **Heys SD**, Walker LG, Smith I, Eremin O: Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg* 1999; 229: 467-77
91. **Hindman BJ**, Todd MM, Gelb AW, Loftus CM, Craen RA, Schubert A, Mahla ME, Torner JC: Mild hypothermia as a protective therapy during intracranial aneurysm surgery: a randomized prospective pilot trial. *Neurosurgery* 1999; 44: 23-32
92. **Hotchkiss RS**, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 138-50

93. **Hubacek JA**, Stuber F, Frohlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, Rothe G, Schmitz G: Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29: 557-61
94. **Ibelgaufts H**: Dictionary of cytokines. Basel, Switzerland, Editiones Roche, 1995
95. **Ishikawa K**, Tanaka H, Takaoka M, Ogura H, Shiozaki T, Hosotsubo H, Shimazu T, Yoshioka T, Sugimoto H: Granulocyte colony-stimulating factor ameliorates life-threatening infections after combined therapy with barbiturates and mild hypothermia in patients with severe head injuries. *J Trauma* 1999; 46: 999-1007
96. **Ishikura H**, Uedono Y, Yamagami K, Arai T, Takeyama N, Tanaka T: Activation of neutrophil function by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor improves the survival of rats with peritonitis. *Surg Today* 1996; 26: 694-9
97. **Jacobi CA**, Ordemann J, Zieren HU, Volk HD, Bauhofer A, Halle E, Muller JM: Increased systemic inflammation after laparotomy vs laparoscopy in an animal model of peritonitis. *Arch Surg* 1998; 133: 258-62
98. **James PT**: Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 2004; 22: 276-80
99. **Keusch GT**: The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 2003; 133: 336S-40S
100. **Kimura A**, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, Kurata K: Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med* 2002; 30: 1499-502
101. **Knaus WA**, Sun X, Nyström P-O, Wagner DP: Evaluation of definitions for sepsis. *Chest* 1992; 101: 1656-62

102. **Kurz A**, Sessler DI, Lenhardt R, The Study of Wound Infection and Temperature Group: Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical- wound infection and shorten hospitalization. The New England Journal of Medicine 1996; 334: 1209-15
103. **Kurz A**, Sessler DI, Narzt E, Bekar A, Lenhardt R, Huemer G, Lackner F: Postoperative hemodynamic and thermoregulatory consequences of intraoperative core hypothermia. J Clin Anesth 1995; 7: 359-66
104. **Kuzlan M**, Pawlaczyk K, Wieczorowska-Tobis K, Korybalska K, Breborowicz A, Oreopoulos DG: Peritoneal surface area and its permeability in rats. Perit Dial Int 1997; 17: 295-300
105. **Le Gall JR**, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. JAMA 1993; 270: 2957-63
106. **Le Tulzo Y**, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amlot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drenou B: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock 2002; 18: 487-94
107. **Levy MM**, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31: 1250-6
108. **Liles WC**, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. J Exp Med 1996; 184: 429-40
109. **Lim CM**, Sun KM, Ahn JJ, Kim MJ, Kwon Y, Lee I, Koh Y, Kim DS, Kim WD: Hypothermia protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. Intensive Care Med 2003; 29: 453-9

110. **Lorenz W**, Reimund K-P, Weitzel F, Celik I, Kurnatowski M, Schneider C, Mannheim W, Heiske A, Neumann K, Sitter H, Rothmund M: Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery* 1994; 116: 925-34
111. **Lorenz W**, Stinner B, Bauhofer A, Rothmund M, Celik I, Fingerhut A, Koller M, Lorijn R, Nyström P-O, Sitter H, Schäfer H, Schein M, Solomkin JS, Troidl H, Wyatt J, Wittmann DH, Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part one: Rationale and hypothesis. *Inflamm Res* 2001; 50: 115-22
112. **Ludbrook J**: Interim analyses of data as they accumulate in laboratory experimentation. *BMC Med Res Methodol* 2003; 3: 15
113. **Macario A**, Dexter F: What are the most important risk factors for a patient's developing intraoperative hypothermia? *Anesth Analg* 2002; 94: 215-20
114. **Mantz J**, Paugam-Burtz C: Hypothermia, sepsis, and the granulocytes: lessons to learn beyond the cytokines. *Crit Care Med* 2004; 32: 1974-5
115. **Marik PE**, Zaloga GP, the Norasept II Study Investigators: Hypothermia and cytokines in septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26: 716-21
116. **Marion DW**, Obrist WD, Carlier PM, Penrod LE, Darby JM: The use of moderate hypothermia for patients with severe head injuries: a preliminary report. *J Neurosurg* 1993; 79: 354-62
117. **Marshall JC**: Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 391-405

118. **Martin GS**, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 1546-54
119. **Matsuoka K**, Ueno T, Morita K, Kawano H, Yamaguchi K, Maekawa T, Tangoku A, Oka M: Effects of moderate hypothermia on proinflammatory cytokine production in a rat model of caerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 2002; 26: 12-7
120. **Matthay MA**: Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344: 759-62
121. **McCarter MD**, Naama HA, Shou J, Kwi LX, Evoy DA, Calvano SE, Daly JM: Altered macrophage intracellular signaling induced by protein-calorie malnutrition. *Cell Immunol* 1998; 183: 131-6
122. **McWhirter JP**, Pennington CR: Incidence and recognition of malnutrition in hospital. *BMJ* 1994; 308: 945-8
123. **Melling AC**, Ali B, Scott EM, Leaper DJ: Effects of preoperative warming on the incidence of wound infection after clean surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 358: 876-80
124. **Members of the ACCP/SCCM consensus conference committee**, Bone RC, et al: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-74
125. **Micklewright A**: Nutritional status at submission for dietetic services and screening for malnutrition at admission to hospital. *Clin Nutr* 1999; 18: 3-4
126. **Miki C**, Inoue Y, Toiyama Y, Ojima E, Kobayashi M, Hatada T, Araki T, Kusunoki M: Deficiency in systemic interleukin-1 receptor antagonist production as an operative risk factor in malnourished elderly patients with colorectal carcinoma. *Crit Care Med* 2005; 33: 177-80



127. **Minnecci PC**, Deans KJ, Banks SM, Eichacker PQ, Natanson C: Meta-analysis: the effect of steroids on survival and shock during sepsis depends on the dose. *Ann Intern Med* 2004; 141: 47-56
128. **Mira JP**, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF: Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282: 561-8
129. **Mirzanejad Y**, Roman S, Talbot J, Nicolle L: Pneumococcal bacteremia in two tertiary care hospitals in Winnipeg, Canada. Pneumococcal Bacteremia Study Group. *Chest* 1996; 109: 173-8
130. **Moher D**, Schulz KF, Altman D: The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *JAMA* 2001; 285: 1987-91
131. **Monneret G**, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A: Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 2003; 31: 2068-71
132. **Monneret G**, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A: The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004; 95: 193-8
133. **Mowe M**: Treatment of malnutrition in elderly patients. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002; 122: 815-8
134. **National Center for Health Statistics**. Deaths from 282 selected causes. 2003. Einzusehen unter:  
<http://www.cdc.gov/nchs/datawh/statab/unpubd/mortabs/gmwkiii.htm>
135. **Nelson S**: A question of balance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1365-7

136. **Nolan JP**, Morley PT, Vanden Hoek TL, Hickey RW: Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Ilcor* 2003; 118-21
137. **Norton EB**, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Kazembe PN, Dobbie H, Reller LB, Jarvis WR, Jason J: Clinical predictors of bloodstream infections and mortality in hospitalized Malawian children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 145-51
138. **O'Brien JM**, Jr., Abraham E: Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. *Crit Care Med* 2004; 32: S202-S208
139. **Oberholzer A**, Oberholzer C, Moldawer LL: Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28: N3-12
140. **Oberholzer A**, Oberholzer C, Moldawer LL: Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16: 83-96
141. **Omran ML**, Salem P: Diagnosing undernutrition. *Clin Geriatr Med* 2002; 18: 719-36
142. **Pannen BH**: Etiology and sequelae of perioperative accidental hypothermia. *Anaesthesiol Reanim* 2002; 27: 4-8
143. **Payette H**, Coulombe C, Boutier V, Gray-Donald K: Weight loss and mortality among free-living frail elders: a prospective study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54: M440-M445
144. **Pelletier DL**, Frongillo EA, Jr., Habicht JP: Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. *Am J Public Health* 1993; 83: 1130-3
145. **Picarel-Blanchot F**, Alvarez C, Bailbe D, Pascual-Leone A-M, Portha B: Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism* 1995; 44: 1519-26

146. **Polderman KH**: Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med* 2004; 30: 556-75
147. **Polderman KH**: Application of therapeutic hypothermia in the intensive care unit. Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality--Part 2: Practical aspects and side effects. *Intensive Care Med* 2004; 30: 757-69
148. **Polderman KH**: Hypothermia in practice: role of cytokines, haemodynamic management and prevention of complications. *Intensive Care Med* 2004; 30: 2284-5
149. **Popp E**, Sterz F, Bottiger BW: Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Anaesthesist* 2005; 54: 96-106
150. **Pugh TD**, Klopp RG, Weindruch R: Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 157-65
151. **Rai J**, Gill SS, Kumar BR: The influence of preoperative nutritional status in wound healing after replacement arthroplasty. *Orthopedics* 2002; 25: 417-21
152. **Rangel-Frausto MS**: The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 299-312, vii
153. **Rangel-Frausto MS**, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-23
154. **Rehbinder C**, Baneux P, Forbes D, van Herck H, Nicklas W, Rugaya Z, Winkler G: FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995. *Lab Anim* 1996; 30: 193-208

155. **Rello J**, Ricart M, Mirelis B, Quintana E, Gurgui M, Net A, Prats G: Nosocomial bacteremia in a medical-surgical intensive care unit: epidemiologic characteristics and factors influencing mortality in 111 episodes. *Intensive Care Med* 1994; 20: 94-8
156. **Rivers E**, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 1368-77
157. **Robertson CS**, Foltz R, Grossman RG, Goodman JC: Protection against experimental ischemic spinal cord injury. *J Neurosurg* 1986; 64: 633-42
158. **Ronco C**, Bellomo R, Lonneman G, Agarwal PK, Kumari R, Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ, Hotchkiss RS, Karl IE: Sepsis -- Theory and Therapies. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 1600-2
159. **Rubinson L**, Diette GB, Song X, Brower RG, Krishnan JA: Low caloric intake is associated with nosocomial bloodstream infections in patients in the medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2004; 32: 350-7
160. **Russwurm S**, Stonans I, Schwerter K, Stonane E, Meissner W, Reinhart K: Direct influence of mild hypothermia on cytokine expression and release in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 215-21
161. **Safar P**, Klain M, Tisherman S: Selective brain cooling after cardiac arrest. *Crit Care Med* 1996; 24: 911-4
162. **Safar P**, Tisherman SA, Behringer W, Capone A, Prueckner S, Radovsky A, Stezoski WS, Woods RJ: Suspended animation for delayed resuscitation from prolonged cardiac arrest that is unresuscitable by standard cardiopulmonary-cerebral resuscitation. *Crit Care Med* 2000; 28: N214-N218

163. **Salman H**, Bergman M, Bessler H, Alexandrova S, Beilin B, Djaldetti M: Hypothermia affects the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 431-6
164. **Sarcia PJ**, Scumpia PO, Moldawer LL, DeMarco VG, Skimming JW: Hypothermia induces interleukin-10 and attenuates injury in the lungs of endotoxemic rats. *Shock* 2003; 20: 41-5
165. **Sasse KC**, Nauenberg E, Long A, Anton B, Tucker HJ, Hu TW: Long-term survival after intensive care unit admission with sepsis. *Crit Care Med* 1995; 23: 1040-7
166. **Schmied H**, Kurz A, Sessler DI, Kozek S, Reiter A: Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty. *Lancet* 1996; 347: 289-92
167. **Schwab S**, Georgiadis D, Berrouschot J, Schellinger PD, Graffagnino C, Mayer SA: Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. *Stroke* 2001; 32: 2033-5
168. **Scrimshaw NS**: Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr* 2003; 133: 316S-21S
169. **Scrimshaw NS**, Taylor CE, Gordon JE: Interactions of nutrition and infection. *Am J Med Sci* 1959; 237: 367-72
170. **Sessler DI**: Perioperative heat balance. *Anesthesiology* 2000; 92: 578-96
171. **Sessler DI**: Complications and treatment of mild hypothermia. *Anesthesiology* 2001; 95: 531-43
172. **Shadduck RK**, Nagabhushanam NG: Granulocyte colony stimulating factor. I. Response to acute granulocytopenia. *Blood* 1971; 38: 559-68

173. **Shiozaki T**, Hayakata T, Taneda M, Nakajima Y, Hashiguchi N, Fujimi S, Nakamori Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H: A multicenter prospective randomized controlled trial of the efficacy of mild hypothermia for severely head injured patients with low intracranial pressure. Mild Hypothermia Study Group in Japan. *J Neurosurg* 2001; 94: 50-4
174. **Singleton KD**, Wischmeyer PE: Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res* 2003; 35: 486-91
175. **Slade E**, Tamber PS, Vincent J: The surviving sepsis campaign: Raising awareness to reduce mortality. *Crit Care* 2003; 7: 1-2
176. **Stinner B**, Bauhofer A, Lorenz W, Rothmund M, Plaul U, Torossian A, Celik I, Sitter H, Koller M, Black A, Encke A, Greger B, van Goor H, Hanisch E, Hesterberg R, Klose KJ, Lacaine F, Lorijn RHW, Solovera J, Margolis C, Neugebauer E, Nyström P-O, Reemst PHM, Schein M, Solovera J, Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part three: individual patient, complication algorithm and quality management. *Inflamm Res* 2001; 50: 233-48
177. **Sullivan DH**, Walls RC: Impact of nutritional status on morbidity in a population of geriatric rehabilitation patients. *J Am Geriatr Soc* 1994; 42: 471-7
178. **Sung J**, Bochicchio GV, Joshi M, Bochicchio K, Costas A, Tracy K, Scalea TM: Admission serum albumin is predictive of outcome in critically ill trauma patients. *Am Surg* 2004; 70: 1099-102

179. **Takeda Y**, Namba K, Higuchi T, Hagioka S, Takata K, Hirakawa M, Morita K: Quantitative evaluation of the neuroprotective effects of hypothermia ranging from 34°C to 31°C on brain ischemia gerbils and determination of the mechanism of neuroprotection. *Crit Care Med* 2003; 31: 255-60
180. **Tisherman SA**, Rodriguez A, Safar P: Therapeutic hypothermia in traumatology. *Shock* 1999; 10: 389-94
181. **Todd MM**, Hindman BJ, Clarke WR, Torner JC: Mild intraoperative hypothermia during surgery for intracranial aneurysm. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 135-45
182. **Torbati D**, Camacho MT, Raszynski A, Sussmane JB, Totapally BR, Hultquist K, Wolfsdorf J: Effect of hypothermia on ventilation in anesthetized, spontaneously breathing rats: theoretical implications for mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2000; 26: 585-91
183. **Tschaikowsky K**, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 1015-23
184. **Turnbull IR**, Javadi P, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM: Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock* 2004; 21: 121-5
185. **Tveita T**: Rewarming from hypothermia. Newer aspects on the pathophysiology of rewarming shock. *Int J Circumpolar Health* 2000; 59: 260-6
186. **Ueda Y**, Suehiro E, Wei EP, Kontos HA, Povlishock JT: Uncomplicated rapid posthypothermic rewarming alters cerebrovascular responsiveness. *Stroke* 2004; 35: 601-6

187. **van den Berghe G**, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R: Intensive insulin therapy in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 1359-67
188. **van den Berghe G**, Wouters PJ, Bouillon R, Weekers F, Verwaest C, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P: Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003; 31: 359-66
189. **Vervloet MG**, Thijs LG, Hack CE: Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 33-44
190. **Vianna RC**, Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Bozza PT, David CM, Castro-Faria-Neto HC: Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. *Shock* 2004; 21: 115-20
191. **Villar J**, Slutsky AS: Effects of induced hypothermia in patients with septic adult respiratory distress syndrome. *Resuscitation* 1993; 26: 183-92
192. **Vincent J-L**: Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med* 1997; 25: 372-4
193. **Warren HS**: Strategies for the treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 952-3
194. **Warren HS**, Suffredini AF, Eichacker PQ, Munford RS: Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347: 1027-30
195. **Weighardt H**, Heidecke CD, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B: Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 2000; 127: 309-15



196. **Wenzel RP**: Treating sepsis. The New England Journal of Medicine 2002; 347: 966-7
197. **Wichterman KA**, Baue AE, Caudry IH: Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. J Surg Res 1980; 29: 189-201
198. **Windsor JA**: Underweight patients and the risks of major surgery. World J Surg 1993; 17: 165-72
199. **Windsor JA**, Hill GL: Weight loss with physiologic impairment. A basic indicator of surgical risk. Ann Surg 1988; 207: 290-6
200. **Wladis A**, Hahn RG, Brismar B, Kjellstrom BT: Induced hypothermia after high-energy soft-tissue injury and subsequent hemorrhagic shock. Shock 2002; 17: 120-6
201. **Wu X**, Stezoski J, Safar P, Bauer A, Tuerler A, Schwarz N, Kentner R, Behringer W, Kochanek PM, Tisherman SA: Mild hypothermia during hemorrhagic shock in rats improves survival without significant effects on inflammatory responses. Crit Care Med 2003; 31: 195-202
202. **Wunderink RG**, Leeper KV, Schein RMH, Nelson S, DeBoisblanc B, Backer B, Fotheringham N, Logan E: Clinical response to filgrastim (r-metHuG-CSF) in pneumonia with severe sepsis. Am J Respir Crit Care Med 153, A123. 1996
203. **Zazzo JF**: Physiopathology and consequences of malnutrition. Rev Prat 2003; 53: 248-53
204. **Zeni F**, Freeman B, Natanson C: Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. Crit care med 1997; 25: 1095-100
205. **Ziegler EJ**, Fisher CJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NNH, Allen IE, Berger HJ, Knatterud GL, LoBuglio AF, Smith CR, HA-1A Sepsis Study Group: Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA- 1A human monoclonal antibody against endotoxin. The New England Journal of Medicine 1991; 324: 429-36

## **6.1 Eigene Publikationen**

Torossian A, **Ruehlmann S**, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A: Pre-treatment with ozonized oxygen (O<sub>3</sub>) aggravates inflammation in septic rats. *Inflamm Res* 2004; 53 Suppl 2: S122-S125

Torossian A, **Ruehlmann S**, Middeke M, Sessler DI, Lorenz W, Wulf HF, Bauhofer A: Deleterious effects of mild hypothermia in septic rats are ameliorated by granulocyte colony-stimulating factor. *Anesthesiology* 2003; 99: 1087-92

Torossian A, **Ruehlmann S**, Middeke M, Sessler DI, Lorenz W, Wulf HF, Bauhofer A: Mild pre-septic hypothermia is detrimental in rats. *Crit Care Med* 2004; 32: 1899-903

## **7 Anhang**

## 7.1 Curriculum vitae

<b>Persönlich</b>	<i>Name:</i>	Sebastian Ulrich Rühlmann
	<i>Anschrift:</i>	420 W. Surf St., #410 Chicago, IL, 60657 USA
	<i>Geburtstag/-ort:</i>	28. Februar 1978 in Duisburg
	<i>Familienstand:</i>	verheiratet mit Rie Alison Sumitani
	<i>Eltern:</i>	Dr. med. Kurt Ulrich Rühlmann und Christiane Rühlmann, geb. Gardian
<b>Schulbildung</b>	<i>1984 – 1986</i>	Grundschule Duisburg-Baerl
	<i>1986 – 1988</i>	Gemeinschaftsgrundschule Roetgen
	<i>1988 – 1997</i>	Privates Franziskus-Gymnasium Vossenack
	<i>06/1997</i>	Allgemeine Hochschulreife
<b>Zivildienst</b>	<i>1997 – 1998</i>	St. Brigida Krankenhaus Simmerath
<b>Studium</b>	<i>1998 – 2000</i>	Studium der Humanmedizin Medizinische Universität zu Lübeck Vorklinischer Abschnitt
	<i>2000 – 2004</i>	Studium der Humanmedizin Philipps-Universität Marburg Klinischer Abschnitt
<b>Famulaturen</b>	<i>03/2001</i>	Overlake Hospital Medical Center Bellevue, Washington, USA Notaufnahme
	<i>03/2002</i>	Praxis Dr. Stefan Rühlmann, Heringen Allgemeinmedizin
	<i>10/2002</i>	Shriners Hospital for Children Chicago, Illinois, USA Orthopädie

	02/2003	St. Brigida Krankenhaus, Simmerath Innere Medizin
<b>Praktisches Jahr</b>	1. Terial	Innere Medizin University of Chicago Pritzker School of Medicine Chicago, Illinois, USA
	2. Terial	Anästhesie / Intensivmedizin University of Illinois at Chicago Chicago, Illinois, USA
	3. Terial	Chirurgie Klinikum der Philipps-Universität Marburg
<b>Ärztliche Prüfungen</b>	09/2000	Ärztliche Vorprüfung
	09/2001	Erstes Staatsexamen
	09/2003	Zweites Staatsexamen
	11/2004	Drittes Staatsexamen
<b>US Examina</b>	04/2002	USMLE Step 1
	10/2004	USMLE Step 2 CS
	11/2004	USMLE Step 2 CK
<b>Lizenzen</b>	11/2004	Approbation als Arzt
	03/2005	ECFMG Certificate
	07/2005	Illinois State Medical License
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	seit 07/2005	Assistenzarzt (Resident) Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine University of Illinois at Chicago Medical Center Chicago, IL, USA

## 7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

### in **Marburg**:

Arnold, Barth, Baum, Becker, Behr, Berger, Bertalanffy, Bien, Czubayko, Engenhardt-Cabillic, Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Hofmann, Jungclas, Kann, Klenk, Klose, Köhler, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lange, Lohoff, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schüffel, Seyberth, Stempel, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Wulf

### in **Lübeck**:

Anemüller, Busch, Engelhardt, Jelkmann, Kühnel, Pagel, Peters, Schäfer, Schmielau, Schramm, Traut, Trautwein, Voswinckel, Weiss, Winking

### in **Chicago**:

Albrecht, Baughman, Coe, Cohen, Feld, Gunnerson, Hanauer, Kirsner, Schmidt, Schwartz

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich als Erstem gerne meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Artur Bauhofer sehr herzlich für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas danken, für die Betreuung der Arbeit, die stetige Ermutigung und Motivation und insbesondere für die tatkräftige Hilfe bei den Tierversuchen. Seine ständige Präsenz, Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben erheblichen Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit gehabt.

Kein geringerer Dank gilt meinem klinischen Betreuer, Oberarzt Priv. Doz. Dr. med. Alexander Torossian. Seine tatkräftige Unterstützung beschränkte sich nicht nur auf alle Bereiche meiner Dissertation, sondern erstreckte sich auf mein Unterfangen in den USA beruflich Fuß zu fassen. Dafür danke ich ihm sehr.

Meinen beiden oben genannten Betreuern möchte ich weiterhin sehr für die mehrfache Publikation des Inhaltes dieser Arbeit danken.

Entscheidenden Beitrag am Gelingen des praktischen Teils dieser Dissertation haben Armin Demant und Ingeborg Vonnemann gehabt. Ihnen danke ich herzlich für die Hilfe im Tier-OP und Labor.

Meinem Bruder Alexander gilt großer Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die Drucklegung, sowie viele weitere Botengänge auf deutschem Boden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Rie und meinen Eltern für die jahrelange uneingeschränkte Unterstützung in jeglichen Belangen bedanken. Mein Studium und diese Doktorarbeit wären ohne sie nicht möglich gewesen.