

ENTWICKLUNG UND EVALUIERUNG EINES  
KONTINUIERLICHEN  
THERMOGRAPHIEMONITORINGSYSTEMS IN DER  
TIEREXPERIMENTELLEN FORSCHUNG IM  
INFEKTIONSMODELL DER SEPSIS

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Philipp Rothe  
geboren am 17.06.1989 in Erfurt

Gutachter

1. apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus, Jena
2. Prof. Dr. Christian Geis, Jena
3. Prof. Dr.-Ing. Alexander Richter, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. November 2019

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung - Neue Herausforderungen der translationalen Forschung</b>	<b>1</b>
1.1 Krankheitsbild Sepsis und translationale Forschung . . . . .	5
1.2 Herausforderungen in der tierversuchsbasierten translationalen Sepsisfor- schung . . . . .	7
1.3 Biologische Grundlagen der Temperaturregulation . . . . .	11
1.4 Physikalische Grundlagen der Detektion von Infrarotstrahlung . . . . .	14
1.5 Detektion von Infrarotstrahlung . . . . .	15
1.6 Praktische Anwendung der thermographischen Überwachung in Tierversuchen	15
<b>2 Hintergrund und Hypothesen</b>	<b>17</b>
<b>3 Methodik</b>	<b>19</b>
3.1 Tiermodell . . . . .	19
3.2 Messaufbau . . . . .	22
3.3 Datenstruktur . . . . .	27
3.4 Berechnungen . . . . .	28
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1 Abbildung physiologischer Temperaturverlauf . . . . .	33
4.2 Abbildung pathophysiologischer Temperaturverlauf . . . . .	33
4.2.1 Überlebende Versuchstiere ohne antibiotische Therapie . . . . .	33
4.2.2 Versterbende Versuchstiere ohne antibiotische Therapie . . . . .	36
4.3 Intervention mittels antibiotischer Therapie . . . . .	39
4.3.1 Überlebende Versuchstiere mit antibiotischer Therapie . . . . .	39
4.3.2 Versterbende Versuchstiere mit antibiotischer Therapie . . . . .	40
4.4 Vergleich zwischen den überlebenden und versterbenden Tieren eines Inter- ventionsarmes . . . . .	45
4.5 Vergleich zwischen progredienter und antibiotisch behandelter Sepsis . . . .	47
4.6 Abgrenzung zu nichtinfektiösen Entitäten . . . . .	49
4.6.1 Septische Wirtsreaktion durch Lipopolysaccharid . . . . .	49
4.6.2 Septische Wirtsreaktion durch Zymosan . . . . .	51

4.7	Vergleich verschiedener Versuchsmodelle . . . . .	52
4.7.1	Versuche mit antibiotischer Therapie mit AUGUR 1.0 . . . . .	52
4.7.2	Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 1.0 . . . . .	54
4.7.3	Testung von Sphingomyelinaseinhibitoren (FIASMA) . . . . .	55
4.7.4	Testung von Wolframat . . . . .	57
4.7.5	Überwachung von gesunden Versuchstieren . . . . .	58
4.7.6	Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 2.0 . . . . .	59
4.7.7	Testung der Übertragbarkeit auf andere Genotypen mittels C5a- Rezeptor-Knockout-Mäusen . . . . .	62
4.7.8	Testung der Übertragbarkeit auf andere Mausstämme mittels FVB- Mäusen . . . . .	65
4.8	Korrelation zu bisher verwendeten nicht-invasiven Bioparametern Körperge- wicht und Clinical-severity-Assessment . . . . .	69
4.9	Vorhersagevalidität . . . . .	75
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
5.1	Prädiktion anhand etablierter Stratifizierungsmethoden . . . . .	78
5.2	Stratifizierung mittels manueller Temperaturerfassung . . . . .	84
5.3	Stratifizierung durch automatisierte Infrarothermographie . . . . .	85
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Perspektive</b>	<b>94</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XX</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XXII</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>XXIV</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>3 R</b>	Reduction, Refinement, Replacement
<b>Abb</b>	Abbildung
<b>ALT</b>	Alanin-Amino-Transferase
<b>Ana</b>	Thyreomimetika-Analogen
<b>AnaT3</b>	Analogen plus Trijodthyronin
<b>aPC</b>	aktiviertes Protein C
<b>AST</b>	Aspartat-Amino-Transferase
<b>ATB</b>	Antibiotikatherapie
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AUC</b>	Area under Curve
<b>AUGUR 1.0</b>	erste Version des Infrarotthermographiesystems
<b>AUGUR 2.0</b>	zweite Version des Infrarotthermographiesystems
<b>bspw.</b>	beispielsweise
<b>BUN</b>	Blutharnstoffkonzentration
<b>C5aKO</b>	C5a-Rezeptor-Knockout-Versuchstier
<b>CIM</b>	Critical-Illness-Myopathie
<b>CIP</b>	Critical-Illness-Polyneuropathie
<b>CLP</b>	Cecal Ligation and Puncture
<b>Crea</b>	Kreatinin
<b>CSCC</b>	Center for Sepsis Control and Care
<b>CSS</b>	Clinical-Severity-Assessment
<b>d. h.</b>	das heißt
<b>DIC</b>	disseminierte intravaskuläre Gerinnung
<b>Hk</b>	Hämatokrit
<b>HMOX-KO</b>	Hämoxygenase-Knockout-Versuchstier
<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>IL-1ra</b>	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
<b>IL-5</b>	Interleukin-5
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 $\alpha$
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NON-SUR</b>	versterbendes Versuchstier (Non-Survivor)

<b>OVLT</b>	Organum vasculosum laminae terminalis
<b>p. i.</b>	post interventionem
<b>PCI</b>	Peritoneal Contamination and Infection
<b>PCT</b>	Procalcitonin
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PTBS</b>	Posttraumatische Belastungsstörung
<b>ROC</b>	Receiver-Operating-Characteristic
<b>rT3</b>	reverses Trijodthyronin
<b>SUR</b>	überlebendes Versuchstier (Survivor)
<b>T2</b>	Dijodthyronin
<b>T3</b>	Trijodthyronin
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>usw.</b>	und so weiter
<b>K</b>	Kelvin

## Zusammenfassung

### **Entwicklung und Evaluierung eines kontinuierlichen Thermographiemonitoringsystems in der tierexperimentellen Forschung im Infektionsmodell der Sepsis**

**Hintergrund:** Tierversuche werden gesellschaftlich, tierschutzrechtlich sowie auch in der Forschung kontrovers diskutiert, zumal die Aussagekraft und die Übertragung von Ergebnissen aus Tierexperimenten in klinische Anwendungen aus diversen Gründen nicht unumstritten ist. Ein Ansatz zur Verbesserung von Tierversuchen ist die möglichst enge Annäherung an die klinische Realität unter besonderer Berücksichtigung heterogener Verläufe, welche zwischen verschiedenen Krankheitsgraden differenziert und nicht alle Individuen mit unterschiedlichem Gesundheitszustand einem einzigen Therapieregime unterwirft. Es sollte daher eine Methodik evaluiert werden, die in einem semilethalen Sepsismodell eine Abschätzung des Versuchsverlaufs ermöglichen soll. Mittels kontinuierlicher, automatisierter Infrarotthermographie sollte ohne invasive Maßnahmen zwischen überlebenden und versterbenden Versuchstieren differenziert werden. Somit wäre diese Technik geeignet, zur Verbesserung und Effizienzsteigerung von Tierversuchen beizutragen.

**Fragestellung:** Ist mittels kontinuierlicher, automatisierter Infrarotthermographie eine Prognosestratifizierung im Laufe der Wirtsreaktion bei polymikrobieller Infektion möglich und wie valide ist diese im Vergleich zu anderen bisher genutzten invasiven (IL-6, PCT) und nicht-invasiven (CSS-Score, Körpergewicht) Prädiktoren. Hierfür wurde die Körperoberflächentemperatur von 237 Mäusen verschiedener Genotypen in mehreren Experimenten anderer Untersucher mit unterschiedlichen Versuchsprotokollen überwacht und mit etablierten Prädiktoren CSS-Score und Körpergewicht sowie den Ergebnissen, die in der Literatur für invasive Messmethoden angegeben werden, verglichen.

**Ergebnis:** Die kontinuierliche, automatisierte Infrarotthermographie ist ein sehr valides Verfahren zur Prognosestratifizierung. Der Cut-Off von 28,7 °C Körperoberflächentemperatur erreicht eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 75 %, die AUC beträgt bereits 12 Stunden präfinal 0,95. Eine statistisch signifikante Prognose ist bis zu 18 Stunden präfinal mit hoher Sicherheit, insgesamt bis 50 Stunden vor Versuchsende möglich. Nach Erreichen des Cut-Off-Wertes beträgt die mediane Überlebenszeit 23 Stunden, sodass die Vorhersage präzise genug ist, um den Todeszeitpunkt zeitlich einzugrenzen und das Versuchstier weiteren Interventionen oder Messungen zu unterziehen. Der CSS-Score erreicht ab 12 Stunden vor dem Versuchsende ähnlichen Prognosewerte, hat dabei jedoch ein deutlich höheres Konfidenzintervall sowie eine mediane Überlebenszeit nach Erreichen des Cut-Off-Wertes von 132 Stunden, was nur eine unpräzise zeitliche Eingrenzung des

Todeszeitpunktes erlaubt. Die Veränderung des Körpergewichts ist kein statistisch signifikanter Prognoseparameter. Die Vorhersagekraft der Körpertemperatur ist vergleichbar mit der von invasiv gemessenen Parametern wie PCT und IL-6, auch wenn die Vorhersagequalität differenziert betrachtet werden muss. Während IL-6 den Tod bis zu 6 Tage im Voraus vorhersagen kann, aber den Zeitpunkt nicht spezifiziert, ist der Vorhersagezeitraum bei der Körperoberflächentemperatur kürzer, aber der Zeitpunkt wird genauer prädiziert.

**Fazit:** Die kontinuierliche, automatisierte Infrarotthermographie eignet sich zur Prognosestratifikation im semilethalen Versuchsmodell der Sepsis bei Kleinnagern. Da die Infrarotthermographie den bisher verwendeten nicht-invasiven Stratifizierungsmethoden in Teilaspekten überlegen und den invasiven Methoden gleichwertig ist, kann diese somit zur Verbesserung von tierexperimentellen Versuchsstrategien beitragen und konventionelle Verfahren ergänzen. Außerdem bietet die kontinuierliche und automatische Erfassung erhebliche Vorteile bei der Dokumentation und objektivierbaren Überwachung von Tierversuchen.

## 1 Einleitung - Neue Herausforderungen der translationalen Forschung

Bereits seit einigen Jahren gibt es eine starke Kontroverse über die wissenschaftliche Arbeitsweise in der biomedizinischen Forschung, insbesondere bei der Durchführung und Legitimation von Tierexperimenten. Daher wurde schon im Jahr 2006 die mangelhafte Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus tierexperimentellen Versuchsreihen auf Menschen in Frage gestellt (Hackam und Redelmeier 2006). Im Rahmen der tierversuchsbasierten Forschung häuften sich jedoch in den letzten beiden Jahren Publikationen mit kritischen Meinungen zu tierexperimentellen Studien, insbesondere in der Erforschung lebensbedrohlicher Infektionen/Sepsis, der resultierenden Wirtsreaktion und der Resolution des septischen Multiorganversagens.

Im Review „Strategies to improve drug development for Sepsis“ (Fink und Warren 2014) sensibilisieren die Autoren für die zahlreichen Misserfolge in der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Daten auf den Menschen und zeigen einige mögliche Lösungswege auf. Hierzu zählt ein nachvollziehbarer, objektiver und verbindlicher Entscheidungsbaum für den Entwicklungsprozess eines neuen therapeutischen Targets bzw. Medikaments (Fink und Warren 2014).

Im selben Jahr wurde von einer amerikanischen Arbeitsgruppe eine Arbeit mit dem Titel „Host responses to sepsis vary in different low-lethality murine models“ (Gentile et al. 2014) veröffentlicht, welche einen Zusammenhang zwischen der mangelnden Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und den bisher verwendeten unterschiedlichen Versuchsprotokollen (hier: Zäkumpunktion versus peritoneale Injektion einer Faecessuspension) herstellt. Diese zeigen wiederum grundsätzlich verschiedene genomische und Leukozytenaktivierungsmuster, welche auch nur mäßig miteinander korrelieren, wenn auch das klinische Erscheinungsbild vergleichbar ist.

Eine kritische Aufarbeitung der bisherigen Forschungsmethoden kommt im Review „Why have clinical trials in sepsis failed?“ (Marshall 2014) zur Sprache. Marshall zählt unter anderem auf, dass wichtige Punkte zur Verbesserung der klinischen Übertragbarkeit die Relevanz der Intervention auf das Outcome der Patienten, das Verstehen der Heterogenität sowie die Verbesserung der Stratifizierung und des Staging von Patienten im Verlauf der Sepsis sind. Des Weiteren ist ein grundsätzliches Überdenken der bisherigen Forschungsmethoden und das Einführen neuer Ansätze vonnöten, um die Ergebnisse präklinischer Studien in der klinischen Anwendung nutzbar zu machen. Dies sind Aspekte, welche im weiteren Verlauf näher erörtert werden.

Noch kritischer sehen dies Seok et al. in der Publikation „Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases“ (Seok et al. 2013), in der die Autoren mittels Unterschieden in Genaktivitäts- und Proteinsynthesemustern zwischen Patienten mit generalisierten Infektionen und Mausmodellen der Sepsis proklamieren, dass mehr Energie und Ressourcen in Studien beim Menschen fließen sollten, anstatt an einem unpassenden Tiermodell festzuhalten. Des Weiteren wird die Korrelation zwischen der Sepsis beim Menschen und Mäusen als zufällig bezeichnet.

Auf diese sehr kritische Darstellung replizierte Osuchowski et al. in dem Review „Abandon the mouse research ship? Not just yet!“ (Osuchowski et al. 2014). Er stellt gegenüber Seok et al. dar, dass bestehende Limitationen des Mausmodells keine neue Erkenntnis seien, die Grundlagenforschung im Tiermodell jedoch bereits bedeutende Einblicke in die Pathophysiologie und Pathobiochemie der Sepsis erbracht habe. Des Weiteren sei es auf Grund mangelnder praktikabler Alternativen unumgänglich, die Tierversuche zu verbessern und praxisnäher zu gestalten, als diesen Forschungsweg gänzlich zu verlassen.

Ein Aspekt, welcher zur wesentlichen Verbesserung der klinischen Anwendbarkeit von Erkenntnissen aus Tierversuchen dient, ist die Einhaltung von Richtlinien im Rahmen der qualitätsorientierten Forschungsarbeit. Dass diese häufig nur unzureichend Berücksichtigung findet, wird aus den Arbeiten von Holman et al. und Iqbal et al. deutlich. In „Where Have All the Rodents Gone? The Effects of Attrition in Experimental Research on Cancer and Stroke“ (Holman et al. 2016) überprüften die Autoren in Tierversuchen der Krebs- und Schlaganfallforschung, wie die Forschungsgruppen die Tierversuche realisierten. Hierbei fiel auf, dass viele publizierte Forschungsergebnisse auf Versuchen basierten, welche mit einer Tieranzahl je Subgruppe mit  $n < 10$  durchgeführt wurden. Aus diesen geringen Tierzahlen wurden häufig auch noch Tiere aus erklärten oder nicht erklärten Gründen in der endgültigen Statistik nicht eingeschlossen. Die Heterogenität der Ergebnisse begründet den „Ausschluss“ von Tieren als vermeintlicher Ausweg aus dem Dilemma inkonsistenter Ergebnisse.

Dies wiederum vermehrt zufällige Tendenzen, abgesehen davon, dass ohne Erklärung ausscheidende Tiere einen Beigeschmack der subjektiven Beeinflussung hinterlassen. Im Rahmen des Reviews „Reproducible Research Practices and Transparency across the Biomedical Literature“ (Iqbal et al. 2016) stellte sich heraus, dass sowohl bei der klinischen als auch biomedizinischen Grundlagenforschung entgegen der internationalen Bestrebungen zur Verbesserung der Transparenz und Reproduzierbarkeit bei den meisten wissenschaftlichen Arbeiten keine vollständigen Datensätze und Protokolle zugänglich waren, welche eine Verfolgung individueller Verläufe erlauben würde.

Die Thematik der kurz vorgestellten Publikationen zeigt eine allgemeine Verunsicherung der internationalen Forschungsgruppen, nachdem sich mehrfach erfolgversprechende experimentelle Ansätze mit aus Tierversuchen gewonnenen Erkenntnissen u. a. zur Pharmakotherapie des Organversagens infolge einer Sepsis (siehe Abb. 1) in klinischen Studien nicht bestätigt haben.

Intervention	Target
Glucocorticoids IVIg (improvement of host defenses)	Immune Response
Anti-endotoxin antibodies BPI (neutralizes LPS) LPS elimination (hemofiltration)	LPS
TNF- $\alpha$ antibodies Soluble TNF receptor	TNF- $\alpha$
IL-1 receptor antagonist	IL-1
Phospholipase A <sub>2</sub> antagonist (reducing PAF) PAF antagonist PAF-acetylhydrolase (PAF inactivation)	PAF
Prostaglandin E1 Thromboxane inhibitors Ketoconazole (thromboxane synthetase inhibitor) Ibuprofen (cyclooxygenase inhibitor)	Arachidonic acid metabolites
Antioxidants: N-acetylcysteine (restoration of cellular antioxidant potential) Selenium (selenium-dependent glutathione peroxidase as O <sub>2</sub> <sup>-</sup> scavenger)	Oxygen radicals
L-NAME (NOS inhibitor) L-NMMA (iNOS inhibitor) Methylene blue (guanylyl cyclase inhibition) PHP (NO scavenger)	NO
AT-III (inhibition of thrombin, Factors IXa, Xa and XIa, XIIa) TFPI (inhibition of Factors X and IX) APC (inactivation of Factors Va and VIIIa)*	Coagulation/inflammation
IFN- $\gamma$ (reactivation of neutrophil immune functions) G-CSF, GM-CSF (increase of immune-competent blood cells) PGG-glucan (increasing phagocytosis and bacterial killing in PMN)	Neutrophil activation
Bradykinin antagonist	Bradykinin
Pentoxifylline (phosphodiesterase inhibitor, cAMP increase)	Phosphodiesterase
C1 inhibitor (inhibition of classical and lectin pathway activation)	Complement system

**Abbildung 1:** Entnommen aus „Novel strategies for the treatment of sepsis“ (Riedemann et al. 2003).

Auf der rechten Seite der Abbildung sind verschiedene Angriffspunkte für die medikamentöse Therapie der Sepsis und des septischen Schocks aufgelistet. Auf der linken Seite sind die in klinischen Studien getesteten Substanzklassen aufgeführt, welche in Tierversuchen einen signifikanten Überlebensvorteil zeigten, aber in der klinischen Testung dann jedoch keinen Benefit aufwiesen.

Es wurde daher der Ruf laut, aus praktischen und ethischen Bedenken Tierversuche zu Gunsten von *in-vitro* und *in-silico*-Methoden zu verlassen. Es zeigt sich allerdings, dass es keine Option ist, vollständig auf alternative Strategien zurückzugreifen. Da Sepsis ein Multi-

organgeschehen ist und auf der Interaktion und Dysfunktion verschiedener Organsysteme beruht, wird sich das komplexe Zusammenspiel in näherer Zukunft kaum ausreichend oder gar vollständig in den o. g. Modellen abbilden lassen. Aber diese können eine Ergänzung sein und erste Hinweise auf Patho- und Wirkmechanismen geben.

Die ethischen Bedenken hinsichtlich der Tierversuche beziehen sich auf die Belastungen, welche ein Tier während der Versuchslaufzeit erleiden muss. Insbesondere die Erforschung des septischen Organversagens bringt ein hohes Maß an potenziell oder tatsächlich belastenden Prozeduren mit sich. Diese können ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse gemindert werden, in dem während des Versuches für eine suffiziente Schmerztherapie gesorgt wird (Minneci et al. 2007). Derzeit mangelt es jedoch noch an Methoden, um das Leiden zu verringern bzw. durch Verringerung der notwendigen Tierzahlen gar zu verhindern.

Außerdem wird die wissenschaftliche Praxis bei Tierversuchen im Allgemeinen kritisiert. Hierbei geht es neben der schwierigen Übertragbarkeit von Ergebnissen hauptsächlich um mangelnde Gruppengrößen (zwecks statistischer Verwertbarkeit und Tendenzen) sowie aus statistischen Auswertungen „verschwindende“ Tiere ohne Aufklärung über die Gründe (Holman et al. 2016). Die Konsequenz hieraus ist die Anfälligkeit für zufällig auftretende Effekte, welche sich später nicht in großen klinischen Studien belegen lassen.

Ein Ansatz zur Lösung dieser Monita wäre eine objektive, kontinuierliche und für die Versuchstiere stressfreie Methode zur ununterbrochenen Überwachung und Datenaufzeichnung.

Aus diesen Überlegungen entstand der Grundgedanke zur „Entwicklung und Evaluierung eines kontinuierlichen Thermographiemonitoringsystems in der tierexperimentellen Forschung im Infektionsmodell der Sepsis“, welches primär die ununterbrochene und kontaktlose Erfassung der Körperoberflächentemperatur bei Nagetieren in diversen Infektionsmodellen im Rahmen der Sepsisforschung sowie die Prädiktion des Outcomes der Versuchstiere in semilethalen Ansätzen ermöglicht.

Hierbei werden zum einen kontinuierlich und automatisch objektive Daten in Tierversuchen generiert, bei denen bisher subjektive Einschätzungen mittels diverser Scores vorherrschten bzw. gar auf eine Differenzierung des Schwerebildes der Erkrankung verzichtet wurde. Des Weiteren wird es ermöglicht, bei dem Krankheitskontinuum Sepsis ein schweregradgesteuertes Versuchsprotokoll zu entwerfen und nicht mehr von einem vorher approximierten Outcome-gesteuerten Modell abhängig zu sein. Somit können gegebenenfalls auftretende

Schwankungen im Versuchablauf detektiert und dabei verwertbare Daten als Zusatznutzen gewonnen werden, was in einem Modell mit vorbestimmter Letalitätsrate nicht ohne weiteres möglich wäre. Zudem wird die Verwendung handschriftlicher Aufzeichnungen von überprüfbareren Daten abgelöst.

### **1.1 Krankheitsbild Sepsis und translationale Forschung**

Die dritte internationale Definition der Sepsis lautet: „Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion nach fehlregulierter Reaktion auf eine Infektion“ (Singer et al. 2016).

Diese verdeutlicht gut die Komplexität und interindividuelle Variabilität dieser Erkrankung, wird jedoch der enormen individuellen und epidemiologischen Bedeutung dieses schwerwiegenden Krankheitsbildes kaum gerecht. Sepsis ist ein weltweites Problem und eine der häufigsten Sterbeursachen (Werdan et al. 2015). Diese Erkrankung stellt ein schwerwiegendes und komplexes Krankheitskontinuum mit inakzeptabel hoher Mortalität dar (Mayr et al. 2014), welche in Abhängigkeit vom Alter und den Komorbiditäten des betroffenen Patienten auch heute noch zwischen 20 - 90 % liegt (Wenzel und Edmond 2000).

In Deutschland treten jeden Tag ca. 400 neue Fälle von Sepsis oder septischen Schocks auf (Werdan et al. 2015), wobei die Mortalität bei der diagnostizierten Sepsis auch heute noch bei 54 % liegt (Bauer et al. 2006, Engel et al. 2007). Somit versterben in Deutschland jährlich ca. 60.000 Personen an Sepsis bzw. dem septischen Schock (Werdan et al. 2015). Die Behandlungskosten belaufen sich in Deutschland jährlich auf 1,77 Mrd. Euro, europaweit sogar auf 6 - 8 Mrd. Euro pro Jahr (Werdan et al. 2015).

Neben der Akuttherapie des septischen Schocks und den damit einhergehenden körperlichen Residuen ist auch die postakute Phase der Sepsis sowie deren Spätschäden eine hohe Belastung für die Betroffenen. Dazu zählen die Critical-Illness-Myopathie (CIM), die Critical-Illness-Polyneuropathie (CIP), die septische Enzephalopathie und die mit der Erfahrung des langen Intensivaufenthalts auftretende Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS), welche mit überproportionaler Sterblichkeit im Vergleich zu Alters-gematchten Bezugskontrollen vergesellschaftet sind (Shankar-Hari und Rubenfeld 2016). In der Pathophysiologie der Sepsis wird der Entwicklung des frühen Leberversagens eine zentrale Rolle zugewiesen (Press et al. 2014, Recknagel et al. 2012b).

Im Bereich der Behandlung der durch Sepsis ausgelösten Wirtsantwort mit konsekutivem Organversagen ist es nicht gelungen, dauerhaft einen Wirkstoff mit belegtem Wirkprinzip zu etablieren (Nat Med, Focus on Sepsis 2012). Bei anderen Krankheiten mit derart

hoher Prävalenz und Mortalität (z. B. koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz oder kolorektale Karzinome) haben Fortschritte in der Forschung zu besserem Verständnis der Pathophysiologie, Identifikation von therapeutischen Targets und somit zu einer signifikanten Reduktion der Sterblichkeit geführt (Prondzinsky und Winkler 2014, Link und Bohm 2014, Pohl und Schmiegel 2013).

Andererseits stehen für dieses mit hoher sozioökonomischer Relevanz belastete Krankheitsbild nur wenig geeignete, reproduzierbare Untersuchungs- und Therapiemodelle zur Verfügung. Hierdurch wird weltweit mit unzulänglichen Modellen eine Unzahl von Untersuchungsreihen durchgeführt. Durch diese Ausgangssituation ist die Entwicklung neuer kausaler Lösungsstrategien deutlich behindert und bedarf dringend neuer Lösungsansätze (Angus 2011, Fink und Warren 2014).

Doch es gibt noch mehr Verbesserungsbedarf in der biomedizinischen Forschung. Hierzu zählen die unzureichende Dokumentation und Nachvollziehbarkeit von Untersuchungsreihen, sowie das „Verschwinden“ von Versuchstieren aus statistischen Auswertungen ohne nachvollziehbare Gründe bei Versuchen mit geringen Tierzahlen (z. B.  $n = 8$ ) (Iqbal et al. 2016). Außerdem werden Rohdaten zu selten öffentlich zugänglich gemacht, Interessenkonflikte nicht konsequent angegeben und negative Untersuchungsergebnisse werden nicht publiziert, was bei Meta-Analysen dann zu einem Überschätzen des therapeutischen Effektes führt (Iqbal et al. 2016, Holman et al. 2016).

Welche Relevanz die dargestellten Problematiken hat, lässt sich gut am Beispiel des Zulassungsverfahrens für das Arzneimittel Drotrecogin  $\alpha$  illustrieren. Dieses Medikament ist ein Analogon zu aktiviertem Protein C (aPC) und sollte bei dem im septischen Schock auftretenden Aktivitätsabfall mit rezidivierender disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC) die antikoagulatorische Funktion unterstützen und somit diese mit hoher Mortalität versehene Komplikation der Sepsis effektiv behandeln (Fourrier et al. 1992, Okajima et al. 1990).

Der Ausgang der Zulassungstudien ist bekannt – das Medikament wurde auf Grund des in Studien belegten ungünstigen Nutzen-Risiko-Profiles freiwillig vom Hersteller vom Markt genommen. Interessanterweise belegen jedoch Subgruppenanalysen der Zulassungstudie PROWESS, aber auch Metaanalysen (Eichacker et al. 2002), dass der therapeutische Effekt von aPC streng mit dem Schweregrad der zu behandelnden Erkrankung assoziiert ist (Bernard et al. 2001). Nachfolgende Studien bestätigten die Beobachtung, dass Patienten mit DIC als Folge einer Sepsis-assoziierten Gerinnungsstörung den höchsten Benefit von einer Behandlung mit aPC aufweisen (Dhainaut et al. 2004, Schauer et al. 2008).

Nachfolgende Untersuchungen (z. B. ADDRESS) konstatierten jedoch ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis in weniger schwerkranken Patienten, was zur freiwilligen Zulassungsrücknahme für die Indikation Sepsis-induziertes Organversagen führte (Abraham et al. 2005).

Wegen der hohen Erwartungen und der grundsätzlichen Bedeutung liegen zur Wirkungsweise und Effektivität von aPC eine Vielzahl auch tierexperimenteller Studien vor, in welchen die unmittelbare Assoziation der Effektivität mit der Schwere des gewählten Sepsismodells gezeigt wurde (Deans et al. 2004, Eichacker et al. 2002).

Zusammenfassend ist also zu konstatieren, dass möglicherweise ein wirksames Agens in der Behandlung der Sepsis nicht zugelassen wurde, da die entscheidenden Studien die in Frage kommende Patientenklientel nicht ausreichend stratifiziert haben. Dies führte dazu, dass bei Patienten, die keine Gerinnungsproblematik im Sinne einer DIC zeigten, was auf Grund des seltenen Auftretens bei den meisten Patienten der Fall war, die Nachteile oder Risiken einer Behandlung mit aPC deutlich hervortraten. Die Vorteile in der Behandlung einer ansonsten kaum beherrschbaren Komplikation blieben bei den verwendeten Studiendesigns leider unterrepräsentiert. Auf die Notwendigkeit einer gesonderten klinischen Prüfung in der Subgruppe besonders schwerkranker Patienten hätte auch schon auf Basis der tierexperimentellen Studien fokussiert werden können.

Wie die letzten Ausführungen zeigen, besteht die dringende Notwendigkeit neue präklinische Studienstrategien zur Untersuchung des entzündungsassoziierten Organversagens unter Nutzung unterschiedlicher innovativer Modelle zu entwickeln. Im systembiologischen Kontext ist die Berücksichtigung unterschiedlicher Verläufe, Schweregrade und Endpunkte ein Schlüsselschritt zur Entwicklung und eventuell der Resolution des Organversagens.

## **1.2 Herausforderungen in der tierversuchsbasierten translationalen Sepsisforschung**

In der Erforschung der Sepsis wird vielfältige Grundlagenforschung mit unzähligen experimentellen Modellen und Versuchsabläufen betrieben, welche neue Erkenntnisse im Pathomechanismus und den Therapiemethoden generieren sollen (Fink 2008). Im Zuge des bislang fehlgeschlagenen Transfers neuer Erkenntnisse in die klinische Praxis (Marshall 2014, Vincent et al. 2010) gibt es eine große Debatte über den Sinn und Nutzen von Tierversuchen (insbesondere bei der Verwendung von Kleinnagern) (Fink und Warren 2014, Seok et al. 2013, Osuchowski et al. 2014).

Andererseits sind Tiermodelle unersetzbar, da Zellkulturen und *in-silico*-Methoden kaum die unterschiedlichen Effekte der Signalkaskaden und Pathomechanismen auf den Gesamtorganismus bzw. die Interaktion der verschiedenen Organsysteme zeigen können (Marris 2006, Cressey 2011).

Diese tierexperimentellen Untersuchungen sind häufig invasiv, schmerzvoll und belastend für die Versuchstiere. Insbesondere gilt dies für die in der Sepsisforschung häufig eingesetzte Induktionsvariante der Cecal Ligation and Puncture (CLP). Hierbei wird die Abdominalhöhle eröffnet, das Zäkum des Versuchstieres abgebunden und anschließend einer graduellen Abstufung mit unterschiedlichen Nadeldicken (je nach avisierten Mortalität) punktiert. Danach wird das Abdomen wieder verschlossen (Rittirsch et al. 2009). Durch den an der Punktionsstelle austretenden Faeces kommt es zu einer intraperitonealen Infektion, welche eine septische Wirtsreaktion auslösen kann. Zusätzlich zu diesem infektiologischen Fokus hat man in diesem Modell zusätzlich das Operationstrauma, auf welches der Organismus der Maus mit einer Entzündungsreaktion reagiert.

Demgegenüber steht das in der Arbeitsgruppe der Experimentellen Anästhesie an der Universitätsklinik Jena validierte Peritoneal Contamination and Infection-Modell (PCI). Dieses beruht auf der transabdominalen Injektion einer Stuhlsuspension in die Abdominalhöhle des Versuchstieres, sodass postoperative Schmerzen, Nekrosen und zusätzliche Leiden vermieden werden (Gonnert et al. 2011, Otto et al. 2015).

Weitere Methoden zur Induktion und Beobachtung einer Wirtsreaktion sind die Injektion von Lipopolysaccharid oder Zymosan.

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Membranbestandteil von gramnegativen Bakterien. Dieser wird u. a. massenhaft beim Zerfall von gramnegativen Bakterien unter antimikrobieller Therapie freigesetzt, was mit dem LPS-Modell imitiert werden soll. Hierbei wird eine Dosis von LPS induziert, wodurch ein Zytokinsturm wie bei einer systemischen Infektion mit gramnegativen Bakterien ausgelöst wird. Dies stellt jedoch eine „sterile Infektion“ dar. Somit ist diese Immunreaktion eigentlich selbstlimitierend und verläuft auf Grund der definierten Menge an auslösendem Agens sehr uniform.

Das LPS bindet an LPS-Bindeprotein, welches wiederum via CD14 an Makrophagen koppeln kann. Außerdem adhärirt LPS zusätzlich an den Toll-Like-Rezeptor 4. Dies führt zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, Interferon- $\gamma$ ). Diese Zytokine lösen über verschiedene Mechanismen die massenhafte und generalisierte Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, Superoxidanionen, Stickstoffmonoxid sowie Prostaglandinen, Hypochlorit und Plättchen-aktivierendem Faktor aus (Rosadini und Kagan 2016).

Zymosan ist ein Homoglucan aus der Zellwand von Hefepilzen. Es aktiviert über den Toll-

like-Rezeptor-2 den alternativen Weg des Komplementsystems und sorgt somit für eine dem LPS-Modell ähnlichen sterilen Entzündung. Im Unterschied zu Untersuchungen mit Lipopolysaccharid jedoch mit einem schwächeren anfänglichen Zytokinsturm (Volman et al. 2005).

Die Zahl der verwendeten Versuchstiere stieg bis 2013 kontinuierlich bis auf ca. 3 Mio. Tiere pro Jahr. Erst in den letzten Jahren ist auf Grund strikterer Vorgaben und restriktiverer Genehmigungsverfahren eine leichte Abnahme zu verzeichnen (Tierschutzbericht der Bundesregierung 2015). Die Verlaufskontrolle und die Einschätzung des Belastungsgrades von Versuchstieren bei experimentellen Untersuchungen in translationaler Sepsisforschung sind zeitaufwendig und von subjektiver Einschätzung geprägt (Gonnert et al. 2011). Außerdem werden von Aufsichtsbehörden zunehmend objektive und dokumentensichere Aufzeichnungen gefordert. Bei progredienten und hochdynamischen Krankheitsverläufen (wie bspw. der Sepsis) resultiert aus Unkenntnis des Gesundheitszustandes eine hohe Variabilität bei Daten- und Probenerhebungen. Jedoch sehen die meisten Versuchsprotokolle in diesen Studien lediglich eine Behandlungsform für Tiere mit verschiedenem Schweregrad vor (Osuchowski et al. 2007). Dabei ist die Probennahme zu *a priori* festgelegten Zeitpunkten ungenau, da Tiere mit unterschiedlichem gesundheitlichen Zustand zusammen in prädefinierten Gruppen unabhängig vom tatsächlichen teils variablen Verlauf ausgewertet werden. Dies wird auch dadurch verkompliziert, dass der spätere Verlauf in vielen Versuchsprotokollen trotz Verlaufskontrolle unbestimmt bleibt (Gentile et al. 2014, Iskander et al. 2013b, Molins et al. 2012). Die oben genannten Faktoren resultieren in hoher Streubreite der Forschungsergebnisse und Probleme bei der Übertragung von Forschungsergebnissen in die klinische Praxis.

Des Weiteren sind diese schweregradgetriebenen Versuchsmodelle auf Grund der hohen Anzahl der nötigen Vorversuche und der Notwendigkeit eines Versuchsarmes zur Bestimmung der Letalität eines Modells und einer weiteren Versuchsreihe zur Asservierung biologischen Materials zur pathomechanistischen Auswertung konträr zu den Vorstellungen des Tierschutzes mit den Grundprinzipien der 3R – **R**eduction, **R**eplacement, **R**efinement.

Aus diesem Spannungsfeld wird die Legitimation der tierversuchsbasierten Sepsisforschung in Frage gestellt (Lambeck et al. 2012, Seok et al. 2013, Takao und Miyakawa 2015, Takao et al. 2015). Jedoch sind trotz dieser Limitierungen aktueller Studienprotokolle tierexperimentelle Krankheitsmodelle bei der Evaluation von pathophysiologisch relevanten Mechanismen sowie zur Auswahl und Testung von Wirkstoffkandidaten nach wie vor unverzichtbar (Osuchowski et al. 2014). Denn bei komplexen Multisystemerkrankungen wie Sepsis stellen stark reduktionistische Modelle wie simplifizierte *in-vitro/ex-vivo*-Strategien

oft unzureichende Vereinfachungen mit beschränkter Aussagekraft dar. Das Problem sind nicht die Tierversuche an sich, sondern deren Konzeption (Vincent et al. 2010, Osuchowski et al. 2014).

Eine Möglichkeit, die Aussagekraft von Tierversuche zu optimieren und näher an die klinische Praxis zu bringen, ist die Etablierung einer validen Prognosestratifizierung. Dadurch kann man den Schweregrad des jeweiligen Versuchsablaufes durch das Monitoringverfahren in Echtzeit verfolgen, dieses bei Bedarf an kurzfristige Besonderheiten adjustieren oder Interventionen in Abhängigkeit des Gesundheitszustandes jedes einzelnen Versuchstieres steuern.

Bisher angewendete Methoden wie repetitive Blutentnahme und transthorakale Echokardiographie benötigen Sedierung und/oder Anästhesie (Weixelbaumer et al. 2010, Rudiger et al. 2013). Deshalb sind diese Verfahren personell, technisch und zeitlich aufwendig und kaum in der breiten Anwendung durchführbar. Außerdem stehen diese Maßnahmen im Gegensatz zu den 3R (Russell und Burch 1959), den nationalen Tierschutzrichtlinien (Bundesanzeiger Verlag, TierSchVersV 2013) sowie Expertenempfehlungen (Lilley et al. 2015, Everitt 2015).

Des Weiteren fordert die Tierschutzrichtlinie 2010/63/EU von der Europäischen Kommission (Amtsblatt der Europäischen Union, Richtlinie 2010/63/EU 2010) die Überwachung und Dokumentation des Gesundheitszustandes und Belastungsgrades eingesetzter Versuchstiere. Außerdem werden geeignete Maßnahmen gefordert, um den Tieren unnötige Leiden und Schmerzen in den Experimenten zu ersparen. Die Einhaltung dieser Vorgaben stellt die Wissenschaftler im europäischen Raum unter Zugzwang und vor große Herausforderungen. Ein grundlegendes Problem hierbei ist, dass es keine einheitlichen und objektivierbaren Standards gibt, wie diese Forderungen praktisch und zeitökonomisch umgesetzt werden können.

Die meisten eingesetzten Methoden (direkte Inaugenscheinnahme des Tieres, Gewichtskontrolle, manuelle Temperaturmessung, radiotelemetrische Messverfahren) sind sehr zeitaufwendig und/oder invasiv. Zudem beziehen sie sich teilweise auf subjektiv erfasste Bewertungskriterien. Bei den genannten Methoden ist außerdem die lückenlose Dokumentation nur bedingt möglich und zudem nicht dokumentensicher überprüfbar, da sie nicht automatisiert elektronisch protokollierbar sind. Abgesehen davon bedeutet die manuelle subjektive Einschätzung auch einen erheblichen personellen Zeitaufwand. Die in dieser Dissertation vorgestellte automatisierte Infrarotthermographie kann teilweise oder als kompletter Ersatz dieser subjektiven oder invasiven Parameter erfolgen. Dies befindet sich im Einklang mit den Tierschutzrichtlinien und den 3R-Kriterien. Außerdem können hohe

Versuchstierzahlen gleichzeitig parallelisiert untersucht werden, was Confounder zwischen verschiedenen Versuchsreihen reduziert.

### 1.3 Biologische Grundlagen der Temperaturregulation

Der Stoffwechsel von homöothermen Lebewesen ist auf die Erhaltung einer konstant hohen Körperkerntemperatur ausgerichtet. Diese sind dadurch unabhängiger von der Umgebung und deren Temperaturschwankungen. Dies setzt jedoch ein Gleichgewicht von Wärmebildung und Wärmeabgabe voraus (Pape et al. 2014).

Die Stoffwechselprozesse lebender Organismen folgen thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten und sind mit Wärmeerzeugung und Wärmeabgabe verbunden. Unterschieden werden muss hierbei zwischen dem Körperkern und der Körperschale. Der Körperkern muss physiologisch in engen Grenzen stabil gehalten werden. Zu ihm gehören die lebenswichtigen Organe, in welchen die Stoffwechselprozesse (Enzymkinetikänderungen bei Temperaturschwankungen) ungehindert ablaufen müssen. Demgegenüber steht die Körperschale, welche zur Wärmeregulation und als Grenzschicht zur Umwelt dient und daher unterschiedliche Temperaturbereiche annehmen kann. Die Körperschale nähert sich nach außen immer mehr der Umgebungstemperatur an, bis dahingehend, dass die Extremitäten vom Körperkern thermisch abgekoppelt werden können.

Die Stoffwechselintensität und die abgestrahlte Oberflächentemperatur ist vom (patho-)physiologischen Zustand des Organismus abhängig. Im Organismus werden Nährstoffe schrittweise zu ATP verstoffwechselt, wobei jedoch ca. 75 % Wärme als Nebenprodukt entsteht. Der Energieumsatz und die Wärmeproduktion variiert je nach „Arbeitsintensität“ (also der autonomen und aktiven Muskularbeit), der Umgebungstemperatur, der Nahrungsaufnahme, endokrinem und zirkadianem Rhythmus. Der Wärmeaustausch geschieht hauptsächlich über die Haut durch vier physikalische Mechanismen: Wärmeleitung, Wärmeströmung, Wärmestrahlung und Verdunstung.

Wärmeleitung ist Wärmetransport in einem unbewegten Medium oder durch unmittelbaren Kontakt zwischen zwei verschiedenen Medien. Im Fall der Tierversuche betrifft dies bspw. die Kontaktfläche des Tiers mit dem Käfigboden. Als Wärmeströmung bezeichnet man den Wärmetransport durch Konvektion, das heißt über ein Medium, welches sich relativ zum Körper bewegt und somit an ihm vorbeiströmt. In den durchgeführten Experimenten ist dies die Luft, welche innerhalb des Haltungsschranks mit einem definierten Luftstrom umgewälzt sowie beim Öffnen der Türen zur Observation der Tiere verwirbelt wird. Die

Wärmestrahlung oder auch Radiation ist die im Infrarotbereich abgegebene Wärmeemission, welche mit dem untersuchten Infrarotkamarasystem detektiert wird. Die Radiation ist als thermophysikalischer Energieausgleich zwischen zwei Objekten unterschiedlicher Oberflächentemperatur zu verstehen.

Die Verdunstung erlangt durch die hohe spezifische Verdampfungsenthalpie des Wassers Bedeutung und trägt nicht unerheblich zur Temperaturregulation bei. In dem verwendeten Versuchsaufbau kommt dieser Effekt gleich in zweifacher Form zum Tragen: Einmal durch die Transpiration der Maus als Zeichen der Thermoregulation oder wenn das Tier unter dem Trinkbehälter steht und akzidentiell benetzt werden sollte.

Die Variation der Körperschalentemperatur wird hauptsächlich über die Veränderung der Durchblutung gewährleistet. Das bedeutet: Kommt es zur Kälteexposition, wird die Durchblutung gedrosselt; demgegenüber kommt es bei einer Wärmeexposition zur vermehrten Durchblutung der Körperschale.

Wenn also das Raumklima nicht zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ausreicht, wird mit den vier oben beschriebenen Mechanismen einer Änderung der Körperkerntemperatur entgegengesteuert. Hierfür gibt es eine Reihe von Thermosensoren, welche über den Körper verteilt sind und sowohl die Körperkern- als auch die Körperschalentemperatur erfassen. Außerdem spielt das Thermoregulationszentrum im Hypothalamus eine zentrale Rolle, welches einen Vergleich zwischen Ist- und Sollwert der Körpertemperatur vornimmt.

Wenn der Sollwert im Hypothalamus eine niedrigere Temperatur als den aktuell gemessenen darstellt, werden Mechanismen zur Wärmeabgabe aktiviert. Dies beinhaltet die Verhaltensänderung, d. h. es wird die Wärmeexposition verringert, z. B. durch das Aufsuchen von schattigen Plätzen. Außerdem wird die Wärmeabgabe gesteigert, d. h. es wird die Körperschalendurchblutung gesteigert und vermehrt Schweiß sekretiert. Sollte der Hypothalamus eine niedrigere Temperatur als den aktuellen Sollwert detektieren, werden Mechanismen zur Wärmebildung und zur Minimierung des Wärmeverlustes eingeleitet. Hierbei ist zunächst wieder eine Verhaltensänderung zu beobachten, d. h. es werden wärmere Orte aufgesucht und die Lokomotion aktiviert. Die Wärmebildung wird durch Kältezittern oder zitterfreie Thermogenese gefördert. Letztere Variante ist insbesondere bei menschlichen Säuglingen oder Nagetieren im braunen Fettgewebe lokalisiert. Dieses braune Fettgewebe ist histologisch plurivakuoläres Fettgewebe mit hoher Mitochondriendichte. Hierbei wird über ein Entkopplerprotein (=Thermogenin oder auch Uncoupling Protein) die Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung abgekoppelt, sodass nur Wärme

in den Mitochondrien produziert wird. Allerdings ist hiermit auch ein starker Anstieg des Sauerstoffverbrauchs verbunden.

Eine Verstellung des Sollwerts im Hypothalamus ist auch ohne Änderung der Körpertemperatur möglich. Dies ist bspw. bei Fieber, aber auch durch Schilddrüsenhormone oder im Laufe eines Menstruationszyklus der Fall.

Fieber stellt hierbei eine regulierte Hyperthermie dar, welche durch verschiedenste Erkrankungen ausgelöst werden kann. Der Grundmechanismus besteht in der Erhöhung des Sollwerts der Körperkerntemperatur durch Zytokine. Die Stimulation von Makrophagen oder Lymphozyten durch Krankheitserreger oder Bestandteile bzw. Toxine von Krankheitserregern und anderen Fremdstoffen (Pyrogenen) führen zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen. Hierbei ist hauptsächlich IL-1 $\beta$ , aber auch IL-6, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\alpha$  (und viele andere mehr) zu nennen.

IL-1 $\beta$  bindet an Rezeptoren im *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) in der Wand des III. Ventrikels und führt zur Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). PGE<sub>2</sub> gelangt in den Hypothalamus, wo es zu einer Erhöhung des Temperatursollwertes kommt. Möglicherweise bewirkt auch der direkte Kontakt von IL-1 $\beta$  im Hypothalamus einen synergistischen Effekt. Wahrscheinlich werden in Folge dessen die Signale von Warmsensoren gehemmt und von Kaltsensoren stimuliert.

Die resultierende Körpertemperatur ist ein wichtiger Parameter für das Wohlbefinden von Labortieren (Newsom et al. 2004, Hart 1988, Hankenson et al. 2013). Die Erhaltung des thermischen Gleichgewichts ist ein bestimmender Faktor, aber auch als Indikator einsetzbar (Rembert et al. 2004), da die Körperkerntemperatur im Normalfall in einem engen Bereich reguliert wird (Sessler 2009, Young und Sladen 1996). Diese ist unbeeinflusst vom vaso-konstriktorischen Effekt der peripheren Gefäße. Die Temperatur der Hautoberfläche ist regelhaft niedriger als die Kerntemperatur, bei Menschen in der Regel ca. 2 °C (Sessler 2008). Diese strenge Regulation kann durch Krankheit oder Narkose gestört sein (Sessler 2009). Dieses Gleichgewicht zwischen dem subkutanen Gewebe und dem Wärmeverlust an die Umgebung ist als Infrarotstrahlung detektierbar. Gleichwohl hängt die Wärmeabgabe durch Konvektion und Strahlung von der Umgebungstemperatur und der Luftzirkulation ab. Somit ist zu konstatieren, dass der Wärmeverlust linear bleibt, wenn die Umgebungstemperatur innerhalb kleiner Grenzen stabil bleibt (Sessler 2008).

Eine Hypothermie des Körperkerns stellt somit ein Ungleichgewicht zwischen Wärmeproduktion und Wärmeverlust dar (Gonzalez-Alonso 2012). Als physiologische Kältereaktion kommt es beim wachen und gesunden Tier in Folge dessen zu Piloeraktion, peripherer Vasokonstriktion inklusive hämodynamischer Zentralisierung, Kältezittern und einer erhöhten Stoffwechselrate. Zudem werden akzessorische Warmhaltungsprinzipien wie

Aufsuchen warmer Plätze und Zusammenrollen beobachtet (Gauvin et al. 2006, Cannon und Nedergaard 2004, Paris et al. 2005).

#### 1.4 Physikalische Grundlagen der Detektion von Infrarotstrahlung

Mit dem Planck'schen Strahlungsgesetz

$$\rho(\lambda, T)d\lambda = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1} d\lambda$$

ist der Verlauf der spektralen Energiedichte  $\rho(\lambda, T)$  und damit der Zusammenhang zwischen Temperatur T und der Wellenlänge  $\lambda$  der so genannten Schwarzkörperstrahlung beschrieben (Buzug 2007).

Ein „Schwarzer Körper“ ist dadurch definiert, dass er die gesamte auf ihn einfallende Strahlungsenergie komplett absorbiert. Des Weiteren folgt als Konsequenz aus dem Kirchhoff'schen Gesetz, dass er gleichzeitig seine eigene Wärmeenergie ideal abstrahlen kann. Daraus folgt, dass solche Körper, die die Strahlung gut absorbieren auch gleichzeitig Strahlung gut emittieren können (Emissionsvermögen = 1). Natürlich sind reale Körper eher „graue“ Körper mit einem Emissionsvermögen, welches kleiner als 1 ist und darüber hinaus typischerweise in der Wellenlänge variiert. Dabei gilt, je höher die Temperatur, desto kürzer ist die Wellenlänge  $\lambda_{max}$ , bei der das entsprechende Maximum zu finden ist.

Das dazugehörige Wien'sche Verschiebungsgesetz

$$T\lambda_{max} = 2,898\text{mm K}$$

besagt, dass es einen reziprok-proportionalen Zusammenhang zwischen der Wellenlänge der maximalen Emission eines „Schwarzen Körpers“ und seiner Temperatur gibt (Buzug 2007).

Mit dem Stefan-Boltzman-Gesetz

$$\int_0^{\infty} \epsilon(\lambda, T)\rho(\lambda, T)d\lambda \propto T^4$$

dass auch  $T^4$ -Gesetz genannt wird, ist man in der Lage, die gesamte Strahlungsleistung eines Körpers zu berechnen (Buzug 2007). Die Tatsache, dass die gesamte Strahlungsleistung eine Funktion der Oberflächentemperatur des zu untersuchenden Körpers ist, macht die Ermittlung und Darstellung der räumlichen Temperaturverteilung mit einer Thermographiekamera überhaupt erst möglich.

Auf Grund des Kirch'hoffschen Gesetzes hängt die von einer Thermokamera gemessene Strahlungsleistung nicht allein von der Körpertemperatur ab, sondern sie ist auch eine Funktion des Emissionsvermögens  $\epsilon(\lambda, T)$  (Buzug 2007).

### 1.5 Detektion von Infrarotstrahlung

Das wichtigste Bauteil einer Infrarotkamera ist der Strahlungsempfänger. In ihm wird die einfallende Strahlungsleistung in einen messbaren Strom umgewandelt, der eine Funktion der Temperatur des emittierenden Körpers ist.

Die verwendete Infrarotkamera misst die Abstrahlung  $M$  der Körperoberfläche der Maus in der geeigneten optimalen Wellenlänge von  $\lambda = 8 - 11 \mu\text{m}$ . Dabei berechnet die Infrarotkamera die Oberflächentemperatur  $T$  unter Verwendung des in Kapitel 1.4 erwähnten Stefan-Boltzman-Gesetzes als

$$M = \epsilon\sigma T^4$$

wobei  $M$ =Abstrahlung an der Mausoberfläche;  $\sigma$ =Stefan-Boltzman-Konstante und  $\epsilon$ =Emission der Mausoberfläche (Buzug 2007). Das eingesetzte Thermographiesystem misst die Abstrahlung als Surrogat für die Oberflächentemperatur der Maus und speichert die Messwerte ab.

### 1.6 Praktische Anwendung der thermographischen Überwachung in Tierversuchen

In der translationalen Forschung existieren sehr vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für die verschiedenen Thermographievarianten. Hierbei liegt der Schwerpunkt derzeit vor allem bei diversen infektiologischen Modellen, wobei ein Oberflächentemperaturabfall unter  $32 - 36^\circ\text{C}$  nach bakterieller Infektion mit einem hohen prädiktiven Wert für einen ungünstigen Verlauf assoziiert (Trammell und Toth 2011) ist. Diese Schwelle wurde als ergänzendes Abbruchkriterium und zur Belastungsreduktion in infektiologischen Tierversuchen verwendet (Kort et al. 1998). Außerdem wurde die Thermographie in diesem Setting zur Bestimmung

der pathogenen Virulenz von Krankheitserregern genutzt (Xie et al. 2014). Des Weiteren wurde das thermographische Monitoring zur Effektivitätsabschätzung einer therapeutischen Intervention herangezogen, bis hin zum vollumfänglichen Ersatz einer konventionellen Überlebensanalyse (Bast et al. 2004, Sanchez et al. 2008).

Neben den Anwendungsmöglichkeiten bei infektiologischen Fragestellungen wird die Thermographie auch in der Tumorforschung eingesetzt. Hierbei wird vor allem die lokal gesteigerte Durchblutung und somit die erhöhte Oberflächentemperatur von Tumoren genutzt (Tepper et al. 2013, Hunter et al. 2014).

Weitere Einsatzmöglichkeiten sind die Überprüfung der Vakzinierungseffektivität in der pharmakologischen Forschung im Sinne der 3R (Jennings et al. 2010), das postoperative Monitoring von Versuchstieren (Wu et al. 2014, Xie et al. 2014) oder auch die Routineüberwachung (Ray et al. 2010). Hierbei wird die Oberflächentemperatur häufig als Surrogatparameter für den Gesundheitszustand und den Belastungsgrad von Versuchstieren angewendet. Dies geht so weit, dass die Körperoberflächentemperatur als wesentlicher Parameter für die Entscheidungsfindung humaner Endpunkte in Tierversuchen evaluiert werden konnte (Adamson et al. 2013, Molins et al. 2012, Dellavalle et al. 2014).

## 2 Hintergrund und Hypothesen

Hintergrund:

Auf Grund der mangelhaften Übertragbarkeit der Daten aus Tierversuchen in klinische Studien sowie zur Verbesserung der Einhaltung der 3R-Kriterien soll die kontinuierliche kontaktlose Infrarotthermographie evaluiert werden. Der in Zusammenarbeit mit der Ernst-Abbe-Hochschule Jena entwickelte Tierhaltungsschrank „AUGUR“ soll es ermöglichen, die Körperoberflächentemperatur kontaktlos, automatisiert und kontinuierlich zu erfassen, ohne den Versuchsablauf zu beeinträchtigen. Des Weiteren sollen die Daten zur Vorhersage des Todeszeitpunktes dienen und ein Cut-Off-Wert getestet werden, welcher zur Unterscheidung von überlebenden und versterbenden Tieren eingesetzt werden kann. Diese Prognosestratifizierung soll über viele verschiedene Versuchsprotokolle und Mausstämme eine gute Vorhersagequalität liefern. Hierzu wird diese Methode mit den bisher verwendeten nicht-invasiven und invasiven Stratifizierungsmethoden verglichen. Weitere Anforderungen sind die automatische Messwertspeicherung und die ubiquitäre Verfügbarkeit der Messdaten zur individuellen Versuchsführung.

Hypothesen:

- Mittels der kontinuierlichen, automatisierten Infrarotthermographie kann im semi-lethalen Modell eine frühzeitige, valide und praktikable Prognosestratifizierung in überlebende und versterbende Versuchstiere durchgeführt werden.
- Diese Methode ist dabei valider als die bisher verwendeten nicht-invasiven Stratifizierungsmethoden.
- Die Infrarotthermographie ist den invasiven Stratifizierungsmethoden wenigstens gleichwertig bei geringerem Aufwand und effizienterer Umsetzung.
- Es können pathomechanisch bedeutsame Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsmodellen detektiert werden, ohne dass dies die Prognosevalidität bezüglich des primären Endpunktes einschränkt.

- Es können lückenlos automatisiert Datensätze generiert werden, welche den Versuchsablauf dokumentensicher nachvollziehbar machen.
- Die Tierversuche können von jedem beliebigen Ort aus telekommunikativ überwacht und entsprechende Interventionen eingeleitet werden.
- Die verwendete Technik beeinflusst den Versuchsablauf nicht und hat keinen Einfluss auf die Mortalität in den Versuchen.
- Tierversuche werden ohne Zeitverzug beurteilbar - es kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt auf nicht beeinflussbare Schwankungen reagiert werden und das Modell wird im Gegensatz zu outcome-getriebenen Modellen an den Schweregrad adjustierbar.

### 3 Methodik

#### 3.1 Tiermodell

Hervorzuheben ist zunächst der Umstand, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Daten aus rein observatorischen Beobachtungen mit dem entwickelten automatisierten Thermographiesystem stammen. Es wurden für dieses Projekt keine zusätzlichen Versuchstiere verwendet. Die Herkunft bzw. die Arbeitsgruppen der verschiedenen Versuchstiere mit erfolgter Intervention ist in Tab. 1 dargestellt. Schon an dieser Stelle bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Kooperation.

AG	AG Leiter	Versuchs- zeitraum	Anzahl der Tiere	Mausstamm	getestetes Agens/Genotyp
Immunologie	Prof. Kamradt	27.04.2014 - 09.07.2014	20	C57Bl/6	Antibiotika
Human- genetik	Prof. Baniahmad	16.05.2014 - 27.01.2015	56	C57Bl/6	Thyreomimetika
KAI	Prof. Claus	23.05.2014 - 26.06.2014	8	C57Bl/6	Sphingomylinase- Inhibition
KAI	Prof. Claus	11.06.2014 - 16.12.2015	28	C57Bl/6	LPS und Zyosan
KAI	Prof. Claus	04.08.2014 - 27.04.2015	34	Balb/c	C5-Rez.-KO
KAI	Prof. Claus	12.08.2015 - 26.08.2015	4	FVB	Wolframat
KAI	Prof. Claus	17.03.2015 - 13.10.2015	68	FVB	HMOX-KO

**Tabelle 1:** Auflistung der Herkunft der Versuchstiere für die Evaluation der kontinuierlichen Infrarotthermographie. Ausgenommen sind Versuchstiere, welche vor dem eigentlichen Versuchsbeginn zur Kontrolle von gesunden Mäusen observiert wurden.

Es wurden, wie in Tab. 1 dargestellt, diverse Genotypen der *Mus musculus* untersucht. Eine Selektierung bezüglich des Genotyps erfolgte absichtlich nicht, um die breite Anwendungsmöglichkeit des automatisierten thermographischen Monitorings zu untersuchen.

Das Mausmodell der polymikrobiellen peritonitischen Infektion, welches im Center for Sepsis Control and Care (CSCC) angewendet wird, ist international anerkannt und gut etabliert (Gonnert et al. 2011, Recknagel et al. 2012b, Otto et al. 2012, Sossdorf et al. 2013). Mit diesem Modell sind bereits eine Reihe von Erfolgen bei der Aufklärung der Pathomechanismen der exkretorischen Funktion der Leber als frühes Ereignis der Sepsis gelungen (Jbeily et al. 2014, Gonnert et al. 2013, Gonnert et al. 2012, Recknagel et al. 2012a, Recknagel et al. 2012b, Recknagel et al. 2013). Des Weiteren konnten pharmakokinetische Eigenschaften von Nanopartikeln aufgeklärt werden (Press et al. 2014).

Lambeck et al. untersuchten mithilfe des PCI-Modells die Vergleichbarkeit der Genexpressionsprofile zwischen septischen Mäusen und Proben der pädiatrischen Intensivstation von Kindern mit Sepsis. Diese Genexpressionsprofile zeigten signifikante Übereinstimmungen, sodass postuliert werden kann, dass in diesem Infektionsmodell eine starke Ähnlichkeit der stereotypen Wirtsantwort zwischen Mensch und Maus existiert (Lambeck et al. 2012).

Für die Induktion der Sepsis wird einmalig eine intraperitoneale Injektion einer standardisierten Faecessuspension durchgeführt. Diese Faecessuspension wird im Verhältnis 1:4 mit 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung verdünnt. Das Volumen der injizierten Faecessuspension variiert und korreliert mit dem Schweregrad der angestrebten Schwere der Sepsis. Die standardisierten Dosen für die Induktion sind:  $3,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  Körpergewicht (KG) für eine schwere Sepsis;  $2,0 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG für eine mittelgradige Sepsis;  $1,0 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG für eine leichte Sepsis.

Insgesamt wurden 237 Mäuse mit unterschiedlichen Schweregraden beobachtet. Hierbei reichte die Mortalität von 0 % in den ersten 7 bis hin zu 100 % in den ersten 3 postinterventionellen Tagen.

Die Induktion erfolgt zum Ausschluss von tageszeitlich bedingten Schwankungen, wie bspw. zirkadianer Rhythmik der Cortisolkonzentration oder der Körpertemperatur, regelhaft zwischen 7 und 9 Uhr vormittags.

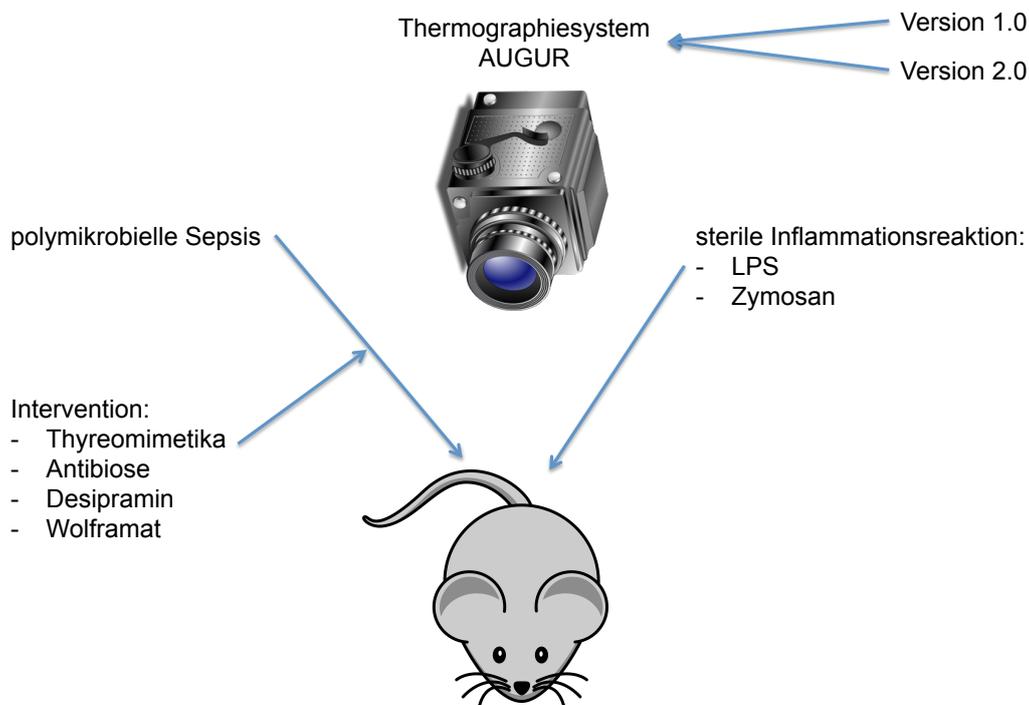
Wenn im Versuchsplan eine antibiotische Therapie der Versuchstiere vorgesehen war, wurde das Carbapenem Meropenem verwendet. Dieses Antibiotikum wird auch in der Humanmedizin zur Behandlung der polymikrobiellen abdominalen Sepsis verwendet. Dosierte dies mit  $25 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$  KG und in physiologischer 0,9%-iger Kochsalzlösung gelöst. Die antibiotische Therapie wurde dann 6 Stunden nach der Sepsisinduktion begonnen und alle

12 Stunden fortgeführt. Gespritzt wurde das Antibiotikum subkutan in die Nackenfalte der Versuchstiere.

Außerdem erfolgte bei allen septischen Tieren eine Volumensubstitution mit  $15 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG mit 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung alle 12 Stunden im Versuchsverlauf. Die Substitution wurde jedoch nur in der Akutphase der Sepsis, meist für die ersten sieben postinterventionellen Tage durchgeführt.

In der Abgrenzung zum Modell der PCI wurden auch andere Induktoren der inflammatorischen Wirtsreaktion eingesetzt. Hierbei handelte es sich um Lipopolysaccharid und Zymosan. LPS wurde hierbei mit einer Dosis von  $15 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$  Körpergewicht dosiert. Zymosan wurde mit  $0,4 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$  Körpergewicht appliziert.

Ein Schema des Versuchsablaufes verdeutlicht die Abb 2.



**Abbildung 2:** Ablaufschema der durchgeführten Versuche. Es wurden mit zwei Versionen des AUGURs diverse Infektionsmodelle der polymikrobiellen Sepsis und der sterilen Inflammationsreaktion untersucht. Die Versuche zur polymikrobiellen Sepsis erfolgten ohne sowie auch mit Intervention (Antibiotikagabe, Verabreichung von Thyreomimetika, Desipramin oder Wolframat).

Die Versuchstiere werden innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Sepsisinduktion engmaschig alle zwei Stunden observiert. Im Folgenden werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet und deren Gesundheitszustand dokumentiert. Hierbei werden insbesondere die Aktivität, das Trink- und Fressverhalten sowie die Atmung und weitere biologische Indikatoren wie bspw. die Körperhaltung und das Aussehen des Felles erfasst (Gonnert et al. 2011).

Dem Inhalt dieser Dissertation entsprechend wurden die Tiere auch thermographisch rund um die Uhr überwacht.

Sobald in den Tierversuchen mit einem ungünstigen Verlauf zu rechnen war, das heißt, die Erkrankung so weit ausgeprägt war, dass sie ein ethisch vertretbares Maß an Schmerz und Leiden überschritt, wurden die Tiere euthanisiert.

Ein wesentlicher Vorteil des thermographischen Monitorings besteht darin, dass den moribunden Tieren vor der Euthanasie final Blut- und Organe entnommen werden können. Dies lässt zum einen Rückschlüsse auf die letztendliche Todesursache zu, zum anderen könnte dies in Zukunft aber auch die Tieranzahl in Tierversuchen reduzieren. Die Euthanasie bzw. die finale Organentnahme wird am tief narkotisierten Tier in einer 2%igen Isofluran-Gasnarkose unter Kontrolle des Ausbleibens des Zwischenzehenreflexes durchgeführt.

### **3.2 Messaufbau**

Der Messaufbau basiert auf einem Tierhaltungsschrank, welcher mit einem Infrarotkammersystem ergänzt wurde („AUGUR“). Die für die Messungen verwendete Thermographiekamera ist eine FLIR SC302, welche ein ungekühltes Mikrobolometer mit einer Arbeitsdistanz von 25 cm besitzt. Auf ein gekühltes System, welches das Grundrauschen verringern würde, musste auf Grund der baulichen Besonderheiten verzichtet werden. Als Grundrauschen ist in diesem Kontext die Wärmeentwicklung der elektrischen Bauteile sowie der Stellmotoren des Thermographiesystems gemeint. Diese wiederum strahlen Wärme ab, welche von der Infrarotkamera selbst detektiert werden kann und somit das Messergebnis als auch die Detailgenauigkeit etwas einschränkt. Bei der installierten FLIR SC302 bedeutet dies eine Pixelkantenlänge von 25 µm bei einer Gesamtauflösung von 320x240 Pixel, einer thermischen Empfindlichkeit von < 0,05 K und einer Messgenauigkeit von 2 % des Ablesewertes.

Die Anforderungen waren die im Haltungsschrank und durch die Verwendung in einem mobilen XY-System vorgegebene geringe Arbeitsdistanz, eine damit verbundene möglichst

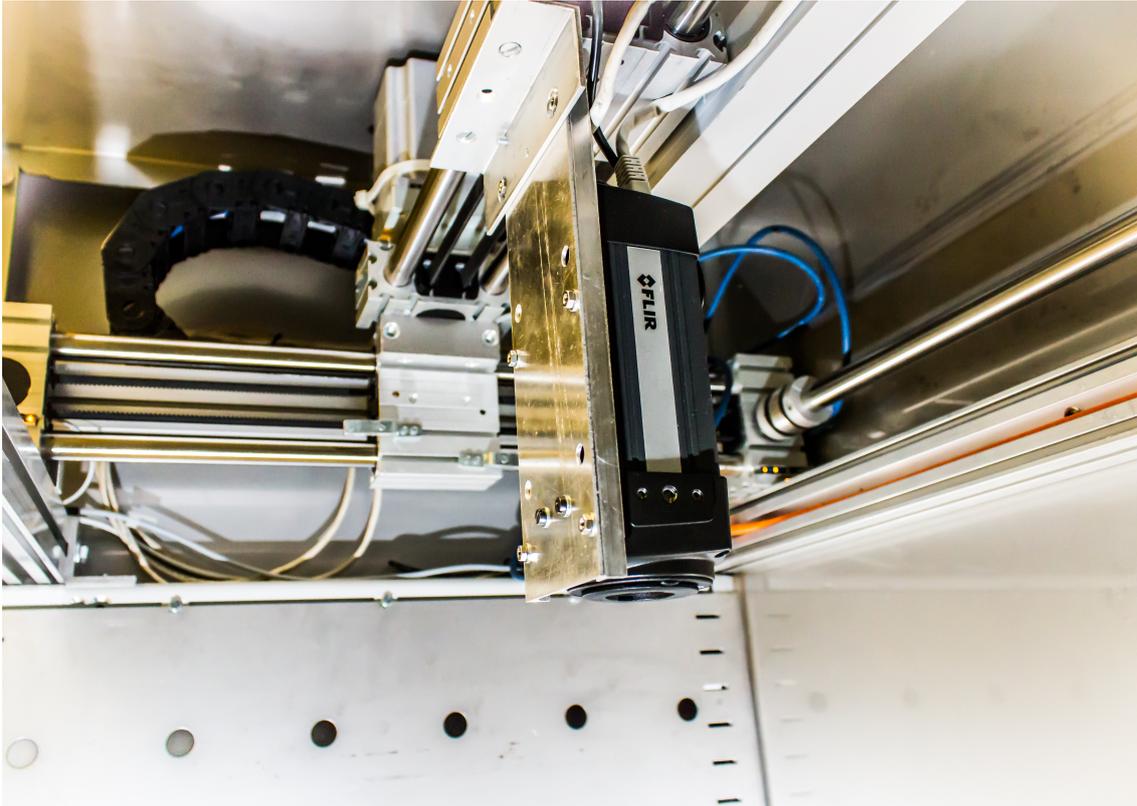
geringe Baugröße und ein geringes Gewicht sowie die Verwendbarkeit in einem beweglichen System.

Die Infrarotkamera wiederum läuft auf einem an der Decke des Haltungsschranks befestigten XY-System via vorprogrammierter Routen die einzelnen Käfige ab (siehe Abb. 3a und 3b). Zusätzlich hierzu wurden Schnittstellen geschaffen, welche ermöglichen, die Erfassung der berührungslos generierten Daten computergestützt vollständig zu automatisieren und über entsprechende Software auch außerhalb der Versuchsräume abrufbar zu machen.



**Abbildung 3a:** Fotografie eines Prototypen des Infrarotthermographiesystems. Dieses basiert auf einem in der Tierversuchshaltung üblichen Haltungsschrank. Er besitzt eine einstellbare Lüftungs- und Beleuchtungseinheit sowie verschiedene Funktionen zum Überwachen und Dokumentieren der Haltungsbedingungen.

Die automatisierte Infrarotthermographie bildet somit die Grundlage für die nicht-invasive und kontinuierliche Abschätzung des klinischen Phänotyps. Die Versuchstiere werden, wie in Kapitel 3.1, beschrieben vorbereitet. Allerdings werden die Tiere in dem entwickelten Überwachungssystem (siehe Abb. 4) in Einzelkäfigen gehalten, um Gruppeneffekte durch gegenseitiges Wärmen oder Beißen zu mindern. Des Weiteren werden somit Re- oder Gruppeninfektionen vermieden. Diese Einzelkäfige haben jeweils eine eigene Wasserzufuhr, eigene Streu und einen separaten Futtermittelvorrat.



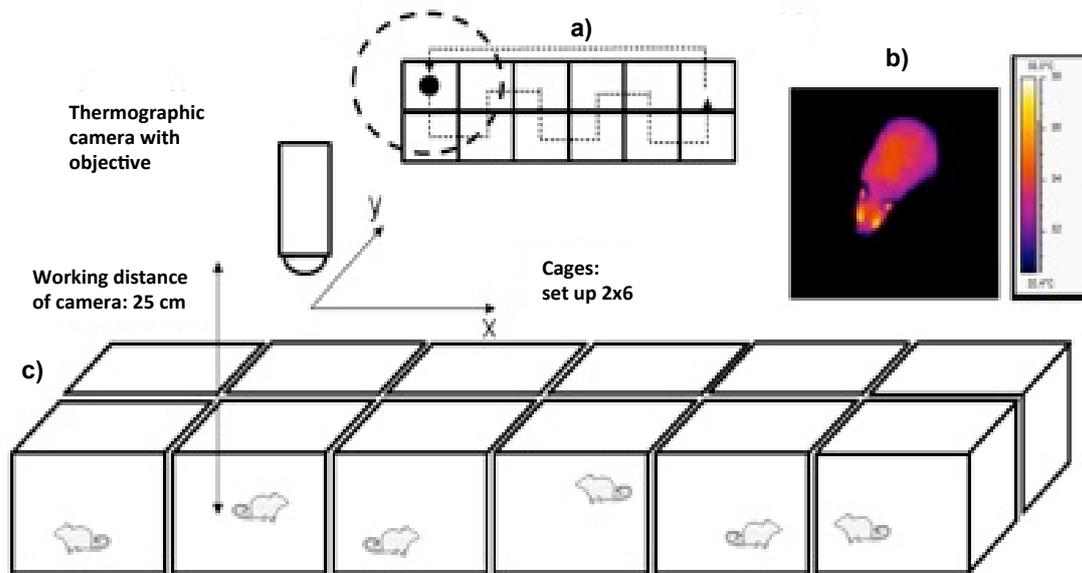
**Abbildung 3b:** Fotografie des Infrarotkameranystems. An der Decke des Schrankes ist die Thermographiekamera auf einem XY-Schienensystem montiert und fährt wie auch in Abb. 4 zu ersehen über die einzelnen Käfige. Der Vorteil ist hier die größere Anzahl von observierbaren Versuchstieren und die größere Flexibilität. Auf diesem Messaufbau basieren auch die in dieser Promotion verarbeiteten Daten.

Wie Abb. 4 zu entnehmen ist, fährt die auf dem XY-System befestigte Thermographiekamera über die Versuchstiere und nimmt Infrarotbilder jedes einzelnen Käfigs auf.

Das Temperatur- und Aktivitätsprofil jedes einzelnen Versuchstieres wird dabei kontinuierlich und vollautomatisch vom Kamerasystem erhoben und über die dazugehörige Rechnerstation und Software ausgewertet.

Die Infrarotkamera fährt von Käfig zu Käfig und macht bei jedem Halt eine Standbildaufnahme des Käfigs. Dieses Bild besteht für die Infrarotkamera aus vielen verschiedenen Pixeln, bei denen jeder einzelne Pixel eine eigene Temperatur repräsentiert. Die Software schneidet nun aus dem entstehenden Temperaturprofil des Käfigs die Tiere aus.

Von diesem extrahierten Infrarotabbild des Versuchstieres wertet die Software nun die minimale, die maximale und die Durchschnittstemperatur aus. Ebenso werden die minimale, die maximale und die Durchschnittstemperatur des Käfigs erfasst, um die Versuchsbedingungen zu dokumentieren.



**Abbildung 4:** Darstellung des Messaufbaus und der Messwertaufnahme.

In Teilabbildung a) ist das Prinzip der auf dem XY-Schienensystem fahrenden Infrarotkamera dargestellt. Die Kamera fährt über die jeweiligen Käfige und nimmt Einzelbilder auf. Die Fahrstrecke der Kamera ist dabei frei programmierbar und somit den unterschiedlichen Anforderungen anzupassen.

In Teilabbildung b) ist eine Falschfarbendarstellung der Temperatur eines Versuchstieres zu erkennen. Hierbei kodiert die Farbe die Temperatur. Blaue Bereiche sind eher kalt, rote und gelbe Bereiche warm. Diese Darstellung aus dem zu der Kamera gehörigen Programm dient jedoch nur der visuellen Kontrolle des regelrechten Versuchsablaufs. Die Messwertaufnahme verläuft unabhängig von dieser visuellen Darstellung.

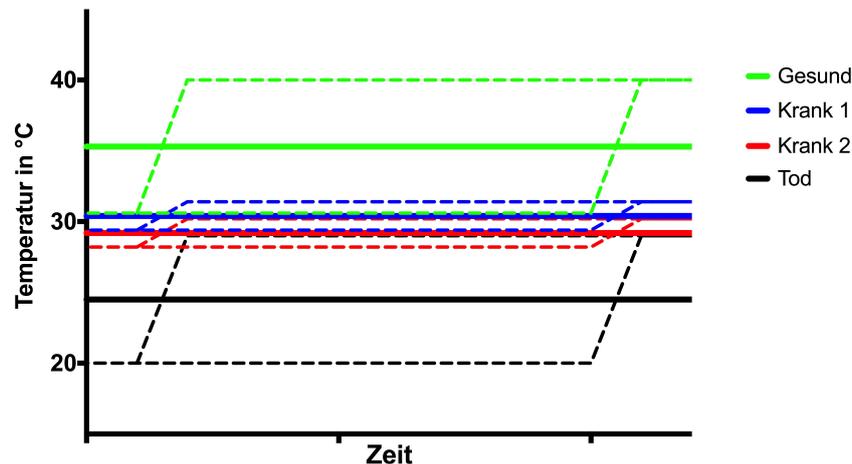
Teilabbildung c) verdeutlicht den Messaufbau noch einmal in einer dreidimensionalen Darstellung.

Die aufgenommenen Messwerte werden in der Software zeitgleich geplottet und können somit jederzeit und von jedem Ort vom Untersucher eingesehen werden. Außerdem werden die Messwerte via vordefinierter Kriterien an den Untersucher mitgeteilt – beispielsweise bei einer Verschlechterung eines Versuchstieres oder dem Erreichen einer für eine Intervention definierten Temperaturschwelle.

Besonders geeignet ist hierfür ein Hysteresemodell (siehe Abb. 5), in welchem vordefinierte Temperaturbereiche als Surrogat für den Gesundheitszustand verwendet werden. Diese Temperaturbereiche sind mit einem Label versehen, welches die Dringlichkeit bzw. das Outcome der Tiere repräsentiert. Diese Temperaturzonen überlappen einander, um unnötig viele Benachrichtigungen bei einzelnen abweichenden Messwerten zu vermeiden. Außerdem ist eine Temperaturmessung nicht aussagekräftig genug für eine Verschlechterung oder Verbesserung des Tieres. Somit kann sich die Temperatur eines Tieres in einem

bestimmten Temperaturbereich bewegen, ohne dass bei einem Schwanken zwischen zwei Grenzwerten eine nicht überschaubare Anzahl an Benachrichtigungen ausgelöst werden. Bei Eintreten in eine dieser Zonen erhält der Untersucher eine Nachricht via SMS, Email etc. und kann nachfolgend über die weitere Verfahrensweise entscheiden.

### Quantilseinteilung mit Hysterese



**Abbildung 5:** Darstellung des Hysterese Modells.

Das Modell der Hysterese beinhaltet in dieser Illustration vier verschiedene Temperaturbereiche, welche jeweils einen anderen Gesundheitszustand repräsentieren. Exemplarisch sind dies Gesund, Krank 1 als Warnhinweis, Krank 2 als Hinweis auf das wahrscheinliche Versterben und die Kategorie Tod. Bei Erreichen einer für jeden Bereich vordefinierten Grenztemperatur wird der jeweilige Bereich „aktiviert“ und der Experimentator informiert. Das Tier kann sich nun in einem Temperaturbereich um diese Grenztemperatur bewegen, ohne dass unzählige Nachrichten an den Untersucher ergehen, da sich diese Bereiche überlappen. Diese Überlappung ist möglich, da die Temperatur nur ein Surrogatparameter für den Gesundheitszustand des Versuchstieres ist und somit ein einzelner Messwert keine große Vorhersagekraft hat – erst der Verlauf der vielen Messungen macht diese Methode sehr valide.

Derzeit ist eine simultane Analyse von bis zu 42 Versuchstieren in Einzelhaltung möglich. Dabei erfolgt die automatische lückenlose Dokumentation der Messparameter sowie die berührungslose, stressfreie und „objektive“ Beobachtung und Bewertung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere.

Somit besteht die Möglichkeit zur Durchführung temperatur- und damit schweregradgekoppelter Interventionen. Dies steht im Gegensatz zu willkürlichen *a priori* ausgewählten Interventionszeitpunkten, wie sie ansonsten ohne invasive Diagnostik möglich wären. Die Konsequenz hieraus ist die Verbesserung der Probenqualität mit der Möglichkeit der Er-

schließung bisher unzugänglichen Probenmaterials, da Organ- und Blutentnahmen bei ansonsten unbeobachtet verstorbenen Tieren möglich werden.

Die prämortale Probengewinnung wird ermöglicht durch den Umstand, dass die als zu versterbend klassifizierten Tiere zeitpunktgenau bei Erreichen einer vorher definierten Temperaturschwelle aus dem Experiment genommen werden können. Dadurch werden aufwendige Überlebenszeitanalysen mit nachfolgenden Untersuchungen zur Aufklärung der Pathomechanismen zusammengeführt. Hierdurch werden Wiederholungsexperimente obsolet, was zwei unmittelbare Folgen hat. Zum einen wird die Anzahl der im Tierexperiment verwendeten Versuchstiere reduziert und zugleich die Ergebnisqualität gesteigert, da die Tiere, die in die Kaplan-Meier-Kurve eingehen, auch pathophysiologisch untersucht werden. Damit wird es möglich, die im Verlauf eines Versuches wechselnden Todesursachen aufzuklären.

Zudem ist automatisiertes thermographisches Monitoring kontinuierlich, zur Gewährleistung des Tag/Nachtrhythmus im Dunkeln möglich und erfordert kein Handling der Tiere, keine Injektion von Substanzen, Transmittern, invasive Probenentnahmen oder den Einsatz von Anästhetika.

### 3.3 Datenstruktur

Die in Zusammenarbeit mit der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena, Prof. Dr. Alexander Richter und Herrn Christian Queissner Dipl.Ing (FH), M.Eng., erstellte Software gibt die abgespeicherten Messdaten als Protokolldatei im .csv-Format aus. Beispielhaft ist in Abb. 6 eine solcher Tabellenausschnitt beigefügt, die vollständigen Rohdaten sind auf dem Datenträger einsehbar.

In dem Tabellenausschnitt (Abb. 6) ist ein Abschnitt einer Datei zu ersehen, welcher die weiteren Berechnungen zu Grunde liegen. In den ausgegeben Rohdatentabellen wird neben einer Zeitachse für jedes Tier die höchste, niedrigste und durchschnittliche Umgebungstemperatur (was dem Käfig entspricht), sowie die höchste, niedrigste und durchschnittliche Objekttemperatur (was dem Versuchstier entspricht) ausgegeben.

Da die Thermographiekamera von Käfig zu Käfig fährt, sich die Temperatur aber im jeweiligen Käfig nicht bei jedem Messdurchgang verändern muss, wurde die Software derart programmiert, dass sie nur Messwerte speichern soll, die sich vom vorherigen Messwert um wenigstens 0,1 K unterscheiden. Dies erhöht die Übersichtlichkeit und Handhabbarkeit der sehr umfangreichen Datensätze, ohne die Präzision und die Ergebnisqualität negativ zu beeinflussen.

Im Anschluss können die Messdaten mit jeder handelsüblichen Tabellenkalkulations- oder Statistiksoftware weiter verarbeitet werden. Für diese Dissertation wurden Excel 2011 für Mac OS X sowie Graphpad Prism 6 und SPSS 24, ebenfalls für Mac OS X, genutzt.

### 3.4 Berechnungen

Da die Thermographiekamera von Käfig zu Käfig fährt und nur Messwerte aufnimmt, die sich um mindestens 0,1 K vom vorherigen Messwert unterscheiden, kommt es zu einer auf der Zeitachse recht inhomogen verteilten Menge an Datensätzen. Dieser Umstand gestaltete die weitere statistische Auswertung mit Graphpad anspruchsvoll, da dieses Statistikprogramm darauf ausgelegt ist, die zu einem Zeitpunkt erhobenen Messwerte miteinander zu vergleichen und für statistische Auswertungen zu verarbeiten.

Unter der Annahme, dass die Software zwei differente Messwerte von 0,1 K abspeichert, muss an jedem beliebigen Zeitpunkt die Temperatur zwischen dem vorherigen und dem nächsten Temperaturmesswert liegen.

Unser Motorsystem mit der Infrarotkamera benötigt je nach Anzahl der observierten Tiere mehr oder weniger Zeit für einen Umlauf. Im Durchschnitt liegt diese Umlaufzeit jedoch zwischen 3 und 5 Minuten für eine komplette Runde über alle Käfige bei normaler Tieranzahl (15 - 25 Tiere).

Da die observierten Versuche zu einer großen Mehrzahl über mehrere Wochen liefen, war es für uns sinnvoll, ein Intervall von 5 min zwischen den einzelnen Messwerten zu definieren, um die Anzahl der Datensätze zu reduzieren, wiederum ohne signifikant an Ergebnisqualität und Genauigkeit einzubüßen.

Herr Christian Queissner entwickelte an Hand dieser Vorbedingungen ein Skript, mit welchem die Rohdatendatei aus Kapitel 3.3 weiterverarbeitet wurde. Hiermit wird jede 5 Minuten im Versuchsverlauf ein aus den vorliegenden Rohwerten „errechneter“ Messwert ausgegeben. Zur Verdeutlichung dieser Berechnung ist dies in Abb. 7a - c näher dargestellt. Dieser „errechnete“ Messwert wurde geometrisch betrachtet aus der Verlaufsgerade zwischen zwei in der Rohdatei gespeicherten Messwerten zu einem vorher bestimmten Zeitpunkt (5 min) bestimmt (siehe Abb. 8).

Im Vorfeld dieser automatisierten Methode, welche nachfolgend als AUGUR 2.0 bezeichnet wird, führten wir zur Testung des Infrarotkamarasystems Messungen ohne die Verwendung des XY-Kamera-Systems aus. Hierbei observierten wir Versuche, indem wir die Kamera zentriert über vier Käfigabteile stellten und somit nur vier Tiere je Versuchsdurchlauf beurteilen konnten, welches nachfolgend als AUGUR 1.0 bezeichnet wird. In der weiteren Bearbeitung schnitten wir die vier Käfige mittels der von FLIR mitgelieferten Software aus

Versuch>System>Position>Objekt>Inhalt	Datum	Uhrzeit	Laufzeit	Temperatur Objekt Min	Temperatur Objekt Max	Temperatur Objekt Mittelwert	Temperatur Global Min	Temperatur Global Max	Temperatur Global Mittelwert	Temperatur Umgebung Intern 1	Temperatur Umgebung Extern Min	Temperatur Umgebung Extern Max	Temperatur Umgebung Extern Mittelwert	Geschwindigkeit	Anstieg
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	08:41:07	01:298	29,9216	34,2353	31,6359	18,3137	34,2353	24,1623						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	08:55:55	0:3764	30,3137	34,549	31,8567	18,7059	34,549	24,6234						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	09:10:43	0:6231	30,4706	34,9412	32,0378	19,1765	34,9412	24,8384						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	09:25:31	0:8698	30,3137	34,9412	32,0332	18,7059	34,9412	24,8751						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	09:40:19	1:1164	30,3137	34,9412	31,9076	18,7843	34,9412	24,9916						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	09:55:09	1:3636	30,2353	35,4118	31,8673	19,1765	35,4118	25,0993						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	10:09:57	1:6103	30,4706	34,3137	31,8875	21,451	34,3137	25,3318						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	10:24:45	1:857	30,1569	35,3333	31,6552	19,7255	35,3333	25,0661						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	10:39:34	2:1038	30,2353	34,7843	31,8509	20,3529	34,7843	25,2626						
Augur 0 Cabinet Experiment 02   Augur 0, X-Achse & amp; Y-Achse Ebene 1   P14 Augur 0   Flr-SC05-Otto_Riegel_Augur_0_Mitte Links & amp; Rechts   SEFSISA   Tier A   Männlich   0   0	26.01.15	10:54:22	2:3505	30,7059	35,8824	32,1144	18,7059	35,8824	25,3964						

**Abbildung 6:** Ausschnitt einer Rohdatendatei.

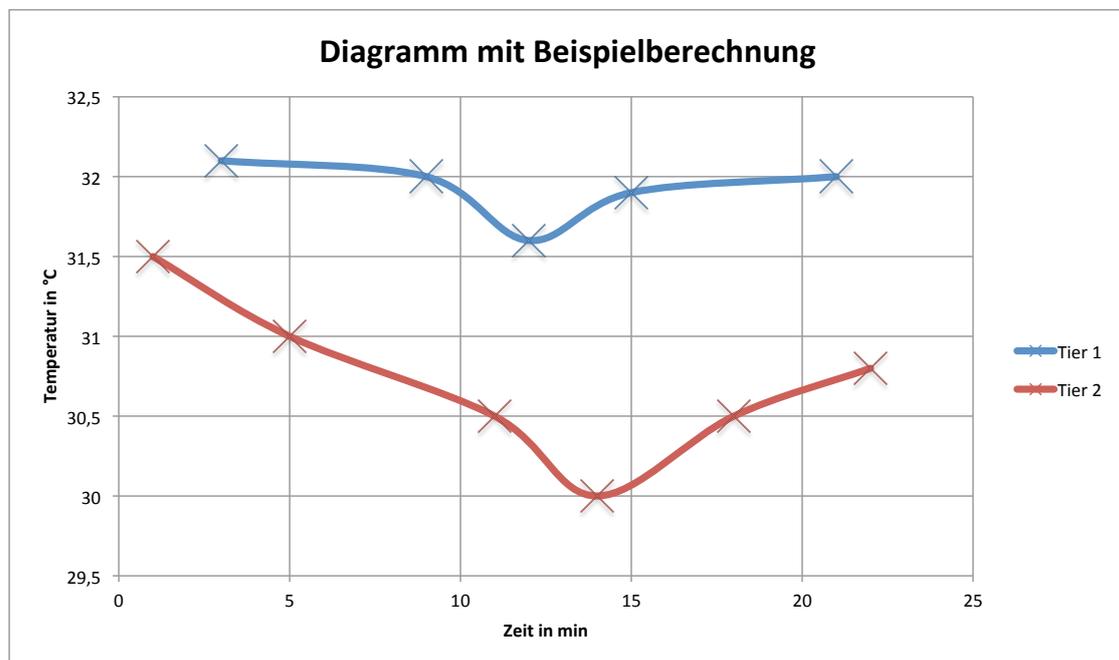
Die erhobenen Messwerte werden von der Software des Thermographiesystems im Dateiformat .csv ausgegeben und in diesem Beispiel mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2011 geöffnet. Zu erkennen ist, dass es für jede einzelne Position im Haltungsschrank eine vordefiniertes Speicherprofil gibt, welchem dann der jeweilige Messwert zugeordnet wird. Daneben ist das Datum, die Uhrzeit sowie die im vorherigen Kapitel aufgeführten verschiedenen Temperaturmesswerte aufgeführt. Hier sind weitere Messwerte bzw. Kontrollparameter aufgeführt, zudem die Größe und Anzahl der jeweils im Käfig erkannten Objekte angegeben. Diese Parameter dienen zur Überprüfung der korrekten Funktion der Software.

Zeit in min	Tier 1
3	32,1
9	32,0
12	31,6
15	31,9
21	32,0

(a)

Zeit in min	Tier 2
1	31,5
5	31,0
11	30,5
14	30,0
18	30,5
22	30,8

(b)



(c)

**Abbildung 7:** Darstellung der Berechnung der Messwerte nach dem im Text genannten Modell. Die Teilabbildungen 7a) und 7b) sind fiktive Messwerttabellen von fiktiven Versuchstieren, welche zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten von der Infrarotkamera erfasst wurden.

In Teilabbildung 7c) sind diese Messwerte graphisch aufgetragen, wie dies auch im Ergebnisteil der Fall sein wird. Dabei sind die einzelnen Messwerte hier mit Kreuzen gekennzeichnet. Um die Verarbeitung mit dem Statistikprogramm Graphpad zu ermöglichen, welches nur mit parallelen Messwerten sinnvoll umgehen kann, wurde auf die Verwendung jedes einzelnen Originalmesswertes verzichtet. Anstatt dessen wurde zu den in den vertikalen Linien zu erkennenden Abständen von 5 Minuten jeweils ein „virtueller“ Messwert generiert. Dieser wurde mittels Berechnung zwischen den zwei Messwerten sowie deren jeweiligem Abstand zu dem Messpunkt heraus errechnet.

Augur 0 Woch 2_01   Augur 0, X-Achse & Y - Achse Ebene 1   P11 Augur 0   Flr_SC305_Otto_Riegel_Augur_0_Vorne Links & Rechts   SEPSIS A   Tier A   Männlich   0   0							
Laufzeit	Temperatur Objekt Min	Temperatur Objekt Max	Temperatur Objekt Mittelwert		Temperatur Global Min	Temperatur Global Max	Temperatur Global Mittelwert
3,6911	24,74	25,34	24,75	24,44	25,34	24,69	
3,7411	24,72	25,31	24,73	24,42	25,31	24,68	
3,7911	24,7	25,29	24,71	24,39	25,29	24,67	
3,8411	24,68	25,26	24,69	24,37	25,26	24,66	
3,8911	24,66	25,24	24,67	24,34	25,24	24,65	
3,9411	24,64	25,21	24,65	24,32	25,21	24,64	
3,9911	24,64	25,2	24,64	24,32	25,2	24,63	
4,0411	24,68	25,2	24,68	24,37	25,2	24,64	
4,0911	24,72	25,2	24,72	24,42	25,2	24,65	
4,1411	24,74	25,2	24,74	24,44	25,2	24,65	
4,1911	24,7	25,2	24,7	24,39	25,2	24,64	
4,2411	24,66	25,2	24,66	24,34	25,2	24,64	
4,2911	24,65	25,21	24,65	24,32	25,21	24,65	
4,3411	24,69	25,26	24,69	24,37	25,26	24,69	

**Abbildung 8:** Weiterverarbeitung der Daten des Versuchstieres aus Abb. 6. Hier wurden virtuelle Messzeitpunkte in 5-Minutenabständen generiert und alle dazugehörigen Messwerte von den Temperaturen des Versuchstieres (=Objekt) und des Käfigs (=Global) berechnet. Aus diesen Tabellen werden im Wesentlichen die Laufzeit sowie der Mittelwert über die Fläche des Versuchstieres für die weiteren Auswertungen verwendet.

und erfassten pro Käfig die jeweilige Höchsttemperatur. Dies war die einzige Möglichkeit, die Temperatur bei langen Versuchslaufzeiten halb automatisiert zu erhalten.

Wenn diese Daten in Auswertungen einfließen, ist dies durch die bei der Verwendung der Käfighöchsttemperatur erfasste höhere Durchschnittstemperatur erkennbar. Die Normalwerte lagen bei AUGUR 1.0 bei ca. 35 °C, im Vergleich zum Mittelwert über das gesamte Tier im automatisierten Verfahren bei AUGUR 2.0 von ca. 31 °C. In den entsprechenden Grafiken wird diese Methode als AUGUR 1.0 oder AUGUR 2.0 erwähnt werden.

Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht darin, dass für alle Tiere auch bei unterschiedlichsten Aufnahmeprofilen parallelisierte Messwerte generiert wurden, die in den weiteren Berechnungen sinnvoll und ökonomisch weiterverarbeitet werden konnten. Dies reduzierte und standardisierte die Anzahl der Messdaten und erleichterte die Weiterverarbeitung erheblich.

Somit konnten im weiteren Verlauf die für die Weiterverarbeitung relevanten Daten errechneter Messzeitpunkt und die dazugehörige Temperatur eines jeden Tieres extrahiert, zusammenfasst (siehe Abb. 9) und mittels Diagrammfunktionen sowie statistischen Analysen verwendet werden.

Die Temperaturdaten werden je nach Analysemethode als arithmetisches Mittel aller Versuchstiere mit 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Die Kurvenverläufe werden zum einen nach dem Verlauf beurteilt, zum anderen bei ähnlichen Verlaufparametern mittels des arithmetischen Mittels über die Versuchslaufzeit verglichen. Dies ist eine Möglichkeit der Analyse von Reihenmessungen in der medizinischen Forschung, welche die Arbeitsgruppe um Altman et al. (Matthews et al. 1990) beschreibt. Zur Analyse des Cut-Off-Wertes werden empirisch ermittelte Cut-Off-Temperaturen mittels Receiver-Operating-Characteristics (ROC) und Vierfeldertafel miteinander verglichen. Die Cut-Off-Werte der verschiedenen

Zeit	P41 Exp2	P51 Exp2	P52 Exp2	P53 Exp2	P54 Exp2	P55 Exp2	P56 Exp2	P13 Exp. 1	P14 Exp. 1
3,75	30,25	31,45	32,03	32,30	31,58	30,89	31,06	32,32	31,68
3,8	30,21	31,48	32,09	32,30	31,61	30,91	31,04	32,38	31,69
3,85	30,14	31,53	32,15	32,31	31,65	30,93	31,03	32,45	31,73
3,9	30,06	31,59	32,21	32,31	31,69	30,93	30,99	32,52	31,76
3,95	29,99	31,64	32,25	32,32	31,73	30,91	30,90	32,58	31,80
4	29,91	31,70	32,28	32,33	31,77	30,89	30,82	32,65	31,83
4,05	29,88	31,76	32,31	32,33	31,82	30,86	30,73	32,64	31,84
4,1	29,89	31,82	32,34	32,34	31,86	30,84	30,64	32,62	31,81
4,15	29,90	31,89	32,37	32,35	31,90	30,83	30,59	32,61	31,78
4,2	29,92	31,95	32,37	32,32	31,88	30,85	30,59	32,60	31,74
4,25	29,93	32,02	32,36	32,28	31,85	30,88	30,58	32,58	31,71
4,3	29,95	31,98	32,34	32,24	31,83	30,90	30,58	32,50	31,72
4,35	29,98	31,89	32,33	32,21	31,81	30,93	30,57	32,41	31,77

**Abbildung 9:** Darstellung einer exemplarisch fertig verarbeiteten Messwerttabelle Hier sind die Daten von Abb. 6 über Abb. 8 umgewandelt worden in ein Format, mit welchem in dem Statistikprogramm Graphpad sinnvoll gearbeitet werden konnte.

Die erste Spalte steht für den Zeitpunkt im Experiment mit dem „virtuellen“ Versuchszeitpunkt alle 5 Minuten, wobei hier die Hexadezimaldarstellung von Stunden abgebildet ist. Die weiteren Spalten sind die Objektmittelwerte der jeweiligen Versuchstiere.

Stratifizierungsmethoden werden zum Vergleich der Vorhersagepräzision mittels Kaplan-Meier-Kurve miteinander verglichen.

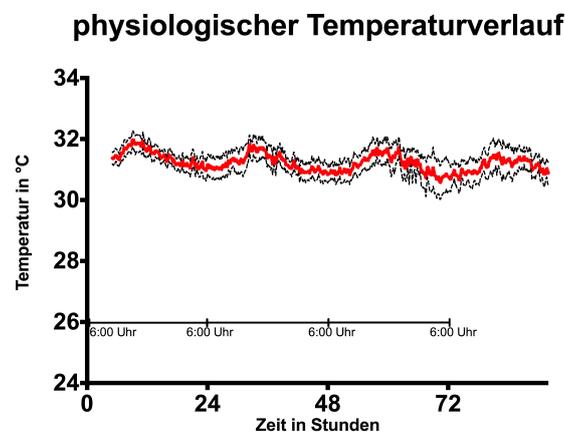
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Abbildung physiologischer Temperaturverlauf

In diesem Versuchsansatz wurden insgesamt 29 gesunde bzw. Sham-behandelte Tiere beobachtet und ausgewertet.

Die gesunden Tiere hatten eine Durchschnittstemperatur von  $31,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit einer Standardabweichung von  $0,6\text{ K}$  (95 % CI).

Außerdem stellte sich ein zirkadianer Rhythmus dar, welcher im Tagesverlauf Schwankungen im Mittel von  $1,0\text{ K}$  zeigte. Der Tagestiefstwert von  $30,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  trat regelhaft gegen 9:00 Uhr auf und der Tageshöchstwert von  $31,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ca. um 23:00 Uhr.



**Abbildung 10:** Darstellung des physiologischen Temperaturverlaufs in  $^{\circ}\text{C}$  ( $n = 13$ ), gemessen mit AUGUR 2.0.

Die durchschnittliche Temperatur der Versuchstiere betrug  $31,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95%). Die zirkadiane Rhythmik der Versuchstiere stellte sich mit einer tageszeitlichen Schwankung von  $1,0\text{ K}$  dar und wies ein Minimum von  $30,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  in den Morgenstunden (9:00 Uhr) und ein Maximum von  $31,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ca. um 23:00 Uhr auf.

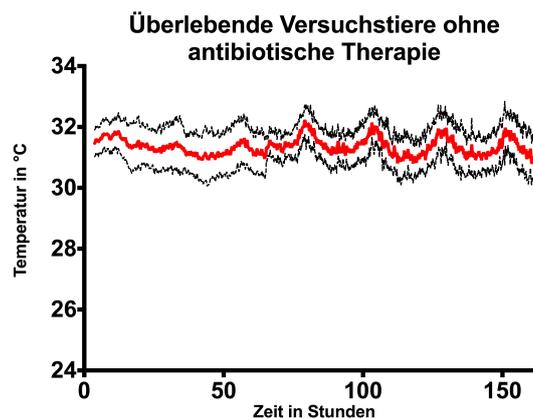
### 4.2 Abbildung pathophysiologischer Temperaturverlauf

#### 4.2.1 Überlebende Versuchstiere nach Sepsisinduktion ohne antibiotische Therapie

In diesem Versuchsansatz wurden insgesamt 42 Tiere in drei unterschiedlichen Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Phänotypen observiert.

Innerhalb der ersten 65 Stunden bleibt die Temperatur bei den überlebenden Tieren zwar stabil (Mittelwert:  $31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), aber die Schwankungsbreite, welche sich in der Standardabweichung von  $\pm 1,1\text{ K}$  ausdrückt, nimmt gegenüber der Kontrollgruppe, aber auch gegenüber dem weiteren Verlauf mit einer Standardabweichung von  $\pm 0,6\text{ K}$  (Mittelwert:  $31,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) deutlich zu (siehe Abb. 11).

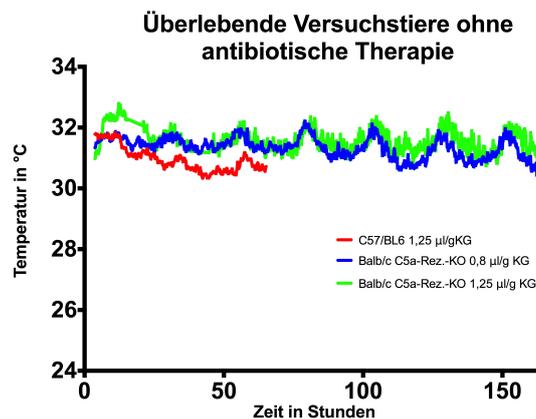
Insgesamt betrachtet unterscheiden sich sowohl die Minimal-/Maximal- und Mittelwerte gegenüber der Kontrollgruppe wenig und auch der zirkadiane Rhythmus ist weiterhin gut zu erkennen. Dieser prägt sich im weiteren Verlauf des Versuches immer stabiler aus.



**Abbildung 11:** Darstellung des Temperaturverlaufes von überlebenden Versuchstieren ohne antibiotische Therapie in  $^{\circ}\text{C}$  ( $n = 42$ ) über die Versuchslaufzeit, gemessen mit AUGUR 2.0. Die durchschnittliche Temperatur der Versuchstiere betrug  $31,42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,43\text{ K}$  (CI: 95%). In den ersten 65 Stunden nach Sepsisinduktion sinkt die Durchschnittstemperatur der Versuchstiere leicht (um  $0,2\text{ K}$ ) ab. Des Weiteren wird die Standardabweichung erkennbar größer gegenüber dem engeren Verlauf im weiteren Versuchsablauf. Auch die zirkadiane Rhythmik ist innerhalb der ersten zweieinhalb Tage nach Sepsisinduktion schlechter erkennbar und kehrt im späteren Verlauf deutlich ausgeprägt zurück.

Betrachtet man die einzelnen Versuche unabhängig voneinander, erkennt man eine gewisse Abhängigkeit vom Genotyp und der Höhe der verwendeten Faecesdosis (Abb. 12).

Beim Mausstamm C57/BL6 mit  $1,25\frac{\text{ml}}{\text{g}}$  KG sinkt die Temperatur um ca.  $1\text{ K}$  ab, um sich dann auf dem niedrigeren Niveau zu halten. Ebenso verlieren die Versuchstiere in diesem Versuch kurzzeitig den zirkadianen Rhythmus, um ihn nach Stunde 50 wiederzuerlangen. Dies ist auch ungefähr der Zeitpunkt, zu dem die Tiere sich auf dem Niveau von  $30,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  wieder stabilisiert haben.



**Abbildung 12:** Darstellung der überlebenden Versuchstiere ohne antibiotische Therapie nach Genotypen und Faecesdosen separiert in °C ( $n = 42$ ) über die Versuchslaufzeit, gemessen mit AUGUR 2.0.

Es wurden Tiere vom Mausstamm C57/BL6 ( $n = 19$ ) mit  $1,25 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  beobachtet. Die durchschnittliche Temperatur dieser Versuchstiere betrug  $30,95 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,40 \text{ K}$  (CI: 95 %). Initial sinkt die Durchschnittstemperatur um ca. 1 K ab, um sich nach ca. 50 Stunden auf dem Niveau von  $30,5 \text{ }^\circ\text{C}$  zu stabilisieren. Danach bildet sich auch der zirkadiane Rhythmus wieder stärker aus.

Des Weiteren wurden Tiere vom Mausstamm Balb/c ( $n = 22$ ) in zwei unterschiedlichen Faecesdosen observiert. Der erste Versuch lief mit  $0,8 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  Faeces ( $n = 18$ ). Die durchschnittliche Temperatur der Versuchstiere betrug  $31,33 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,35 \text{ K}$  (CI: 95 %). Innerhalb der ersten 50 Stunden flacht der zirkadiane Rhythmus ab und tritt danach wieder sehr deutlich hervor.

Bei den Balb/c C5-Rez. KO ( $n = 4$ ) mit  $1,25 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  tritt eine Besonderheit auf. Initial steigt die Temperatur im Verlauf der ersten 22 Stunden um maximal 1,5 K auf  $32,85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Danach verläuft die Kurve beinahe parallel zu den Tieren aus dem vorher betrachteten Versuch. Die durchschnittliche Temperatur der Versuchstiere betrug  $31,58 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,38 \text{ K}$  (CI: 95 %).

Bei den Versuchstieren des Stammes Balb/c und einer Defizienz des C5a-Rezeptors wurden Versuche mit zwei unterschiedlichen Dosen Faeces durchgeführt. Bei den Tieren mit der niedrigeren Dosis von  $0,8 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG bleibt die Durchschnittstemperatur stabil, aber der zirkadiane Rhythmus ist im ersten Versuchsdrittel im Sinne einer Akut-Phase-Reaktion vermindert. Danach kehrt dieser Rhythmus deutlich wieder hervor.

Bei den Tieren, die die höhere Dosis erhalten haben, sieht man paradoxerweise initial eine leichte Temperaturzunahme um maximal 1,5 K innerhalb der ersten 22 Stunden. Dies ist insofern eine Besonderheit, als dass eine Temperaturzunahme im Mausmodell ansonsten nicht beobachtbar war, außer bei diesem Genotyp im Rahmen der Sepsis. Danach verläuft die Temperaturkurve nahezu parallel zu den Tieren, welche die niedrigere Dosis erhalten haben.

#### **4.2.2 Versterbende Versuchstiere nach Sepsisinduktion ohne antibiotische Therapie**

Für die Auswertung der ohne antibiotische Therapie versterbenden Tiere wurden 38 Tiere in drei unterschiedlichen Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Phänotypen und zwei Faecesdosen observiert (Abb. 13 und 14).

Die ohne Intervention versterbenden Versuchstiere (Abb. 13a) bleiben insgesamt über einen Zeitraum von 10 - 13 Stunden von der Temperatur stabil bzw. steigen sogar leicht an. Dann folgt jedoch ein Umkehrpunkt des Graphen, wonach ein rascher, gleichmäßiger Temperaturabfall auf ca.  $26^{\circ}\text{C}$  im Sinne der Kreislaufzentralisation im septischen Schock einsetzt. Auf dem sich dann anschließenden Plateau kommt es ab ca. 18 Stunden vor dem Tod zu einem sehr charakteristischen Temperaturverlauf. Zuerst steigt die Temperatur von dem vorbenannten Plateau um ca.  $1,5^{\circ}\text{C}$  wieder an, um dann nach einem kurzen Umschlagspunkt wieder rapide bis zum Eintritt des Todes abzufallen.

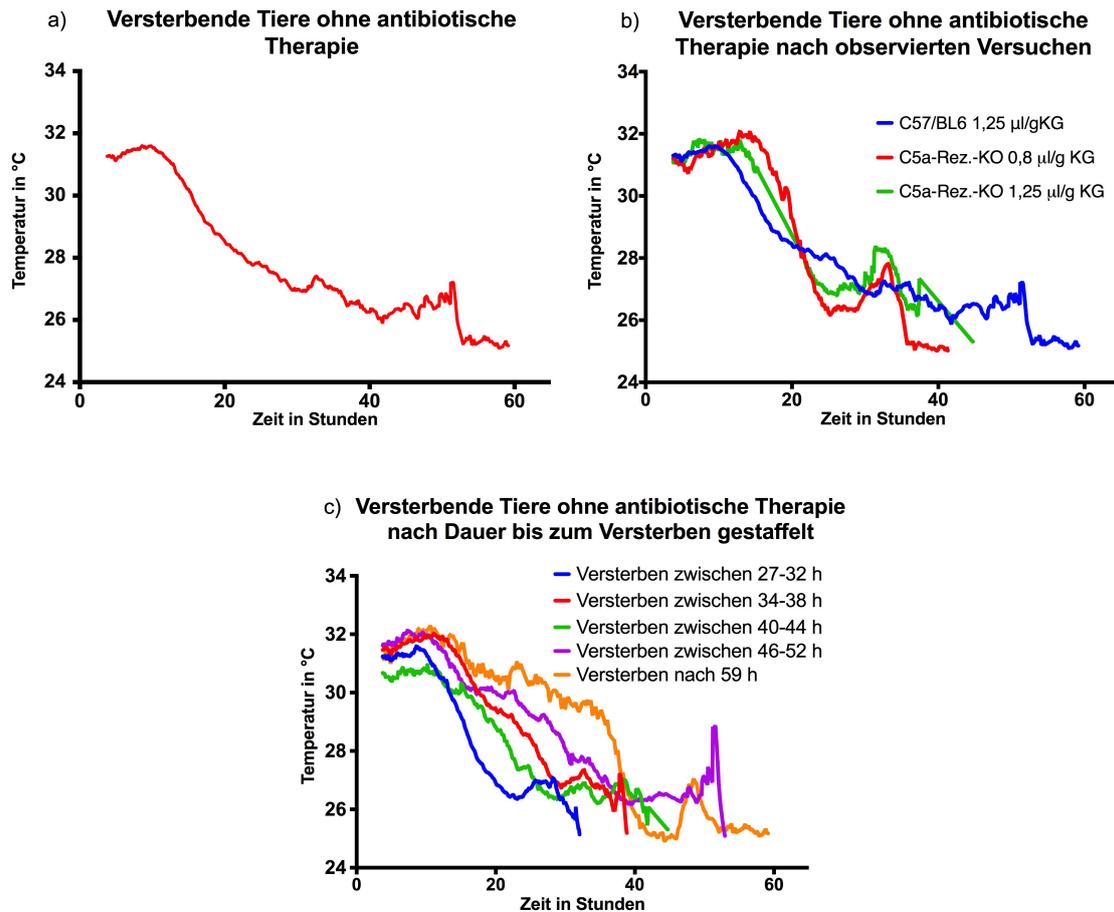
Betrachtet man die einzelnen Versuchsdurchläufe untereinander nach Genotyp und Faecesdosis (Abb. 13b), fallen kleine Unterschiede auf.

Beim Maustyp CL57/BL6 mit der Dosis von  $1,25 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG entspricht die Verlaufskurve der oben unter Abb. 13a) bereits geschilderten. Dies ist insofern nachzuvollziehen, als dass dieses Versuchsregime in der in diesem Kapitel betrachteten Untergruppe den größten Anteil ( $n = 30$ ) ausmacht und damit überrepräsentiert war. Damit gelten dennoch die getroffenen Aussagen umso mehr für diese Gruppe.

Beim Genotyp Balb/c C5a-Rez. KO haben die ohne Intervention versterbenden Tiere unabhängig von der Dosis eine sehr ähnliche Verlaufskinetik. Diese unterscheidet sich jedoch bis auf die Steilheit des Abfalls kaum von der Verlaufskurve der CL57/BL6. Initial bleibt die Temperatur länger stabil, fällt dann aber schneller ab, was ein Hinweis auf eine durch den genetischen Knockout veränderte Immunantwort und eine schnellere Kreislaufzentralisation hindeuten kann. Ebenso fällt der letzte Anstieg der Körperoberflächentemperatur abrupt, steiler und höher aus, fällt dann aber bis zum Versterben des Tieres ebenso schnell wieder ab.

In der nach Todeszeitpunkt gestaffelten Analyse der Temperaturverlaufskurven (Abb. 13c) stellt sich interessanterweise heraus, dass bis auf die primäre Gruppe (Versterben zwischen 27 - 32 Stunden), welche nach ca. zehn Stunden mit der Körperoberflächentemperatur abfällt, beginnen alle anderen Gruppen ab ca. 13 Stunden post infectionem mit der Temperatur zu sinken und unterscheiden sich lediglich in der Steilheit der Kurve von Gruppe zu Gruppe. Außerdem zeigen alle Subgruppen nach dem initialen Drop wiederum einen sehr ähnlichen Verlauf, welcher im weiteren Prozess dann zur Prädiktion der Versterbewahrscheinlichkeit genutzt wurde.

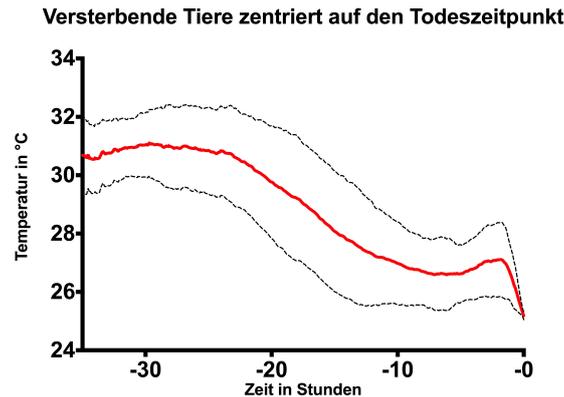
Dieser charakteristische prämortale Verlauf wird noch eindrücklicher, wenn man sich die letzten Stunden der versterbenden Tiere parallelisiert betrachtet (Abb. 14). Hierbei kann man die hohe Reproduzierbarkeit des vorbezeichneten prämortalen Verlaufs anhand der gleich bleibenden Standardabweichung von ca.  $1,5^{\circ}\text{C}$  ersehen.



**Abbildung 13:** Darstellung der Temperatur in °C ( $n = 38$ ) von versterbenden Tieren ohne antibiotische Therapie gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, gemessen mit AUGUR 2.0.

In Teilabbildung 13a) wurden alle Tiere zusammen betrachtet, unterschiedliche Genotypen oder Faecesdosen blieben unrespektiert. Hier zeigte sich eine typische Verlaufskurve, welche auch in allen anderen Teilabbildungen reproduziert wurde. Dieser Verlauf besteht in einem initialen Plateau über 10 - 13 Stunden, einem dann mehr oder weniger steilem aber kontinuierlichem Abfall auf ca. 26 °C. Nach einer Stabilisierung bei Erreichen dieser unteren Temperaturschwelle steigt dann die Temperatur wieder steil um ca. 1,5 °C an, um danach sofort wieder rasch bis zum Versterben des Tieres abzufallen.

In Teilabbildung 13b) sind die Genotypen und Faecesdosen separat dargestellt. Hier wird deutlich, dass der oben geschilderte Temperaturverlauf auf alle Versuchstiere in diesem Versuchsteil anzuwenden ist, sich jedoch die Kinetik nun etwas unterscheidet, wobei der Genotyp einen größeren Einfluss als die Faecesdosis zu haben scheint. Die CL57/BL6 haben einen längeren Verlauf mit einem langsameren initialen Abfall der Körperoberflächentemperatur als die Balb/c C5a-Rez. KO. Diese wiederum bleiben tendenziell zu Versuchsbeginn länger stabil, fallen dann aber drastischer ab. In Teilabbildung 13c) wurden die Tiere nach Ihrem Sterbezeitpunkt gestaffelt, um zu überprüfen, ob später versterbende Tiere eine andere Kinetik zeigen, als früh Versterbende. Alle Versuchstiere haben eine initial stabile Phase von 10 - 13 Stunden, nach der sie analog zum Zeitpunkt ihres Versterbens mehr oder weniger steil abfallen. Früh Versterbende haben einen steilen Abfall, die Kurve von spät Versterbenden verläuft deutlich flacher. Dennoch haben alle dieselbe Grundkinetik.



**Abbildung 14:** Todespunktzentrierte Analyse der versterbenden Tiere. Hierfür wurden die verstorbenen Tiere auf den Zeitpunkt ihres Versterbens zentriert, sodass die Analyse der letzten Stunden vor dem Tod des Tieres unabhängig vom Zeitpunkt des Versterbens möglich wird (gemessen mit AUGUR 2.0). Auch hier zeigt sich die unter 12a) genannte Kinetik als sehr prädiktiv, das heißt der vorbeschriebene Temperaturabfall ab ca. 20 Stunden vor dem Tod ( $29,8\text{ °C} \pm 1,9\text{ K}$  (CI: 95 %)) bis 5 Stunden prä mortal auf  $26,6\text{ °C} \pm 0,99\text{ K}$  (CI: 95 %), das Wiederansteigen um 2,5 Stunden vor dem Tod auf  $27,1\text{ °C} \pm 1,2\text{ K}$  (CI: 95 %) als auch der letzte Abfall mit Tod ( $25,35\text{ °C} \pm 0,17\text{ K}$  (CI:95,%)) sind hier reproduzierbar.

### 4.3 Intervention nach Sepsisinduktion mittels antibiotischer Therapie

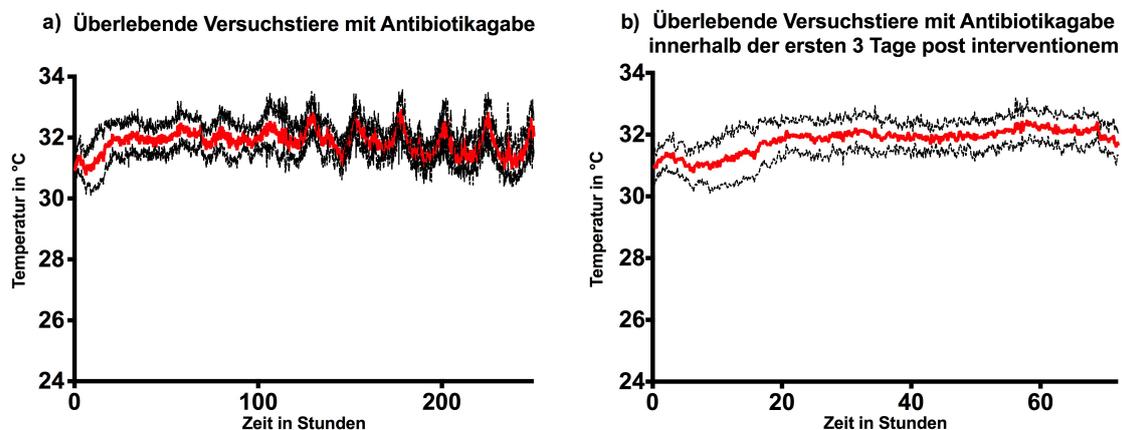
#### 4.3.1 Überlebende Versuchstiere nach Sepsisinduktion mit antibiotischer Therapie

Für die Auswertung der mit antibiotischer Intervention überlebenden Versuchstiere wurden 9 Tiere in sechs unterschiedlichen Versuchsdurchläufen beim Mausstamm FVB mit 2,25 und 2,5  $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG observiert (Abb. 15).

Während bei einer Dosis von 1,25  $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG ohne antibiotische Behandlung die Mehrzahl der Versuchstiere verstorben ist, gibt es mit Intervention sogar Tiere, die wesentlich höhere Dosen Faeces überleben.

Die Versuchstiere haben eine Ausgangskörperoberflächentemperatur von  $31,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ K}$  (CI: 95 %). Auffällig ist, dass die Tiere innerhalb der ersten drei Stunden post interventionem mit einer tendenziellen Steigerung der Körpertemperatur auf  $31,3\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) reagieren. Danach fällt die Körperoberflächentemperatur bis Stunde 7 p. i. leicht auf  $31,0\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) ab. Von Stunde 7 bis Stunde 12 p. i. steigt die Temperatur zwar leicht an, die interindividuelle Streuung nimmt jedoch im Sinne einer differentiellen Immunreaktion zu ( $31,2\text{ °C} \pm 0,9\text{ K}$  (CI: 95 %)). Im weiteren Verlauf steigen die Versuchstiere bis 32 Stunden p. i. wieder mit der Temperatur auf ein stabiles Niveau von  $32,2\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) an, wobei

auch die Streuung wieder deutlich geringer wird. Im Anschluss erreichen die Tiere wieder einen stabilen zirkadianen Rhythmus mit geringen interindividuellen Schwankungen.



**Abbildung 15:** Überlebende Versuchstiere mit antibiotischer Intervention. Darstellung der Körperoberflächentemperatur in °C ( $n = 9$ ) gegen die Zeit in Stunden, gemessen mit AUGUR 2.0.

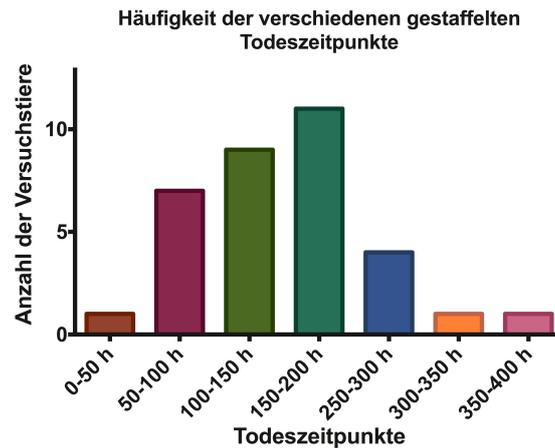
Teilabbildung a) zeigt die gesamte Versuchslaufzeit von ca. 250 Stunden, währenddessen in Teilabbildung b) aus demselben Datensatz die ersten 72 Stunden zur detaillierten Analyse dargestellt wurden.

Ausgehend von einer Körperoberflächentemperatur zu Versuchsbeginn von  $30,97\text{ °C} \pm 0,48\text{ K}$  (CI: 95 %) steigt die Temperatur innerhalb der ersten drei Stunden p. i. auf  $31,33\text{ °C} \pm 0,55\text{ K}$  (CI: 95 %). Von Stunde 3 bis 7 p. i. fällt die Körperoberflächentemperatur leicht auf  $30,99\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) ab. Hierbei nimmt auch die Standardabweichung im Sinne einer größeren Streuung bei individueller Immunantwort zu. Von Stunde 7 bis Stunde 12 p. i. steigt die Temperatur zwar leicht an, die interindividuelle Streuung nimmt jedoch noch zu ( $31,21\text{ °C} \pm 0,89\text{ K}$  (CI: 95 %)). Im weiteren Verlauf steigt die Körperoberflächentemperatur der Versuchstiere bis 31 Stunden p. i. auf ein stabiles Niveau von  $32,15\text{ °C} \pm 0,59\text{ K}$  (CI: 95 %) an, wobei auch die Streuung wieder deutlich abnimmt. Ab ca. Stunde 60 p. i. erlangen die Tiere wieder einen stabilen zirkadianen Rhythmus mit geringen interindividuellen Schwankungen.

#### 4.3.2 Versterbende Versuchstiere mit antibiotischer Therapie

Für die Auswertung der mit antibiotischer Intervention versterbenden Tiere wurden 33 Tiere in sechs unterschiedlichen Versuchsdurchläufen beim Mausstamm FVB mit 2,25 und 2,5  $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG observiert (Abb. 16 bis 19).

Die Tiere versterben über einen deutlich längeren Zeitraum, die meisten zwischen Stunde 50 und 200 des Versuches.

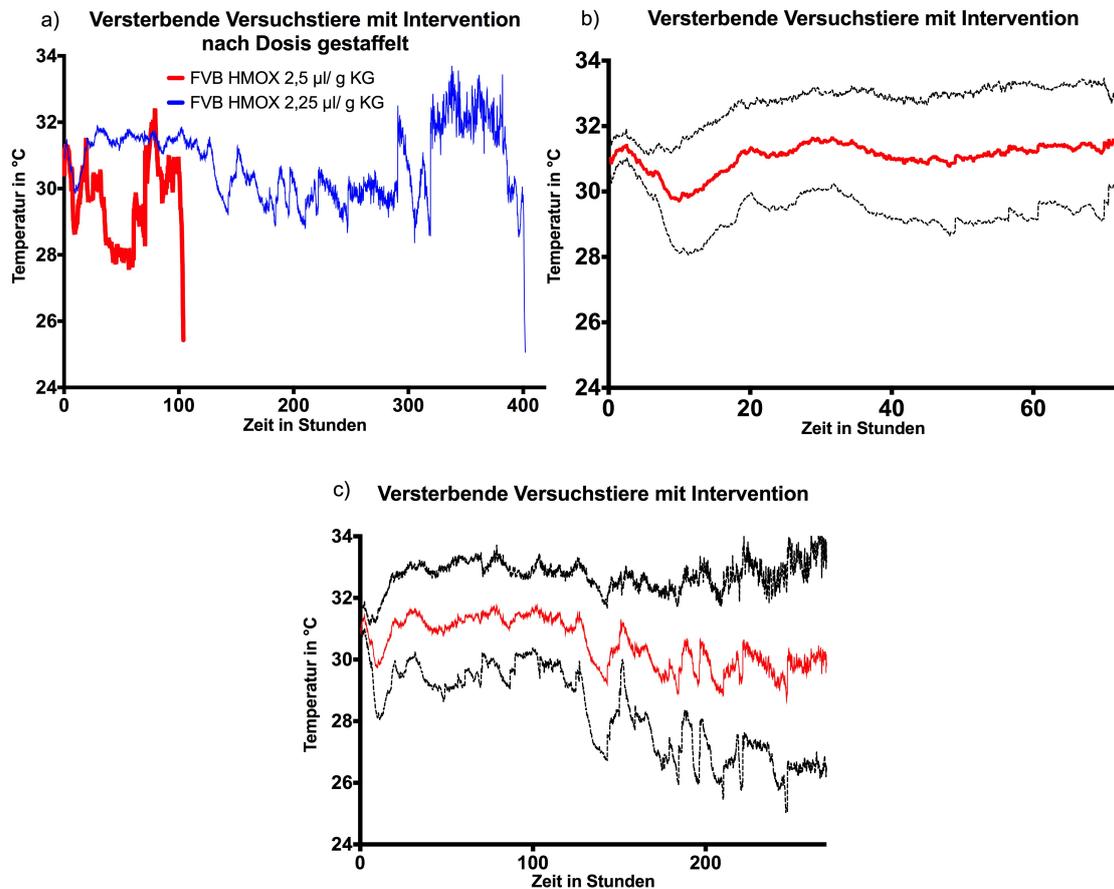


**Abbildung 16:** Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie. Diese Abbildung zeigt die Verteilung der versterbenden Tiere nach Todeszeitpunkten gestaffelt. Hierbei zeigt sich, dass der Großteil der Tiere in einem breiten Zeitfenster zwischen Stunde 50 und 200 p. i. verstirbt.

Die allgemeine Auswertung der Daten ist auf Grund dieser großen Spanne nur für die ersten 72 Stunden sinnvoll, da die große interindividuelle Spannweite eine Auswertung erschwert. Die mit antibiotischer Behandlung behandelten Tiere gehen mit einer Temperatur von  $30,9\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) in den Versuch. Innerhalb der ersten drei Stunden zeigt sich eine tendenzielle Temperaturerhöhung auf  $31,2\text{ °C} \pm 0,4\text{ K}$  (CI: 95 %). Danach fällt die Temperatur auf  $29,9\text{ °C} \pm 1,7\text{ K}$  (CI: 95 %) zum Zeitpunkt 10 Stunden p. i. ab, wobei eine große interindividuelle Schwankung zwischen  $26,4\text{ °C}$  und  $32,5\text{ °C}$  vorliegt. Im weiteren Verlauf erholen sich die Tiere mutmaßlich durch die antibiotische Behandlung auf  $31,3\text{ °C} \pm 1,6\text{ K}$  (CI: 95 %) zur Stunde 20 nach Versuchsbeginn. Danach wird die interindividuelle Schwankung so groß, dass eine generelle Auswertung nicht sinnvoll ist. Währenddessen ein Teil der Tiere relativ zeitnah verstirbt, halten einige Tiere bis Stunde 300 bzw. 350 durch, haben einen normalen zirkadianen Rhythmus und versterben dann sehr plötzlich in der postakuten Phase der Sepsis. Diese Tiere machen auch die langfristige Prognose bei den antibiotisch behandelten Tieren sehr herausfordernd.

Diese diffizile Ausgangslage wird nochmals deutlich, wenn man die Tiere nach dem Todeszeitpunkten staffelt. Denn eine eindeutige Unterscheidung zu Versuchsbeginn ist nicht möglich. Eindeutig wird es erst, wenn die Versuchstiere die  $29\text{ °C}$ -Marke das zweite Mal oder dauerhaft unterschreiten. Wenig überraschend zeigt sich, dass Tiere mit einer höheren Dosis deutlich früher versterben.

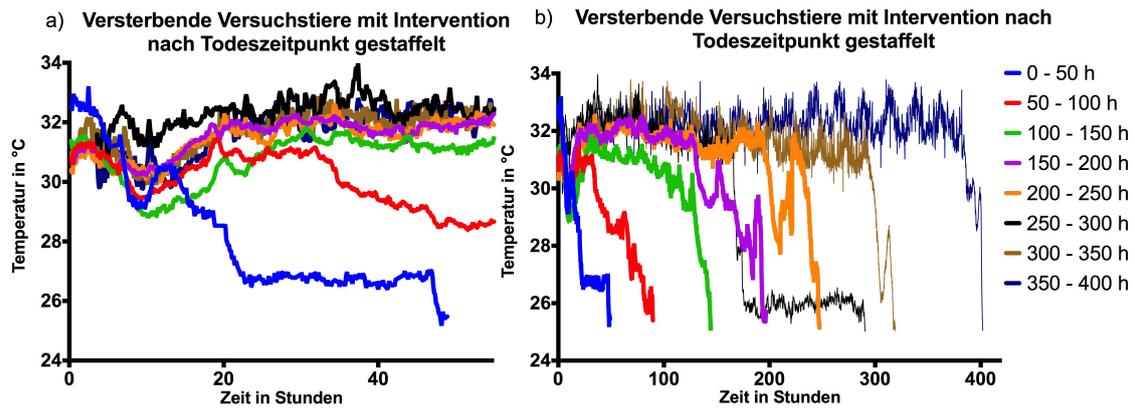
Betrachtet man die Kinetik der Körperoberflächentemperatur auf den Sterbezeitpunkt zentriert, fällt auf, dass diese weniger uniform wie bei den nicht antibiotisch behandelten



**Abbildung 17:** Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie.

Es ist die Temperatur in °C ( $n = 34$ ) gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden, gemessen mit AUGUR 2.0. Teilabbildung a) differenziert zwischen den zwei beobachteten Dosen Faeces. Hier zeigt sich, dass die Versuchstiere mit der höheren Dosis deutlich früher versterben und insbesondere keine Verläufe beinhaltet, welche in der postakuten Phase der Sepsis nach 300 - 400 h versterben.

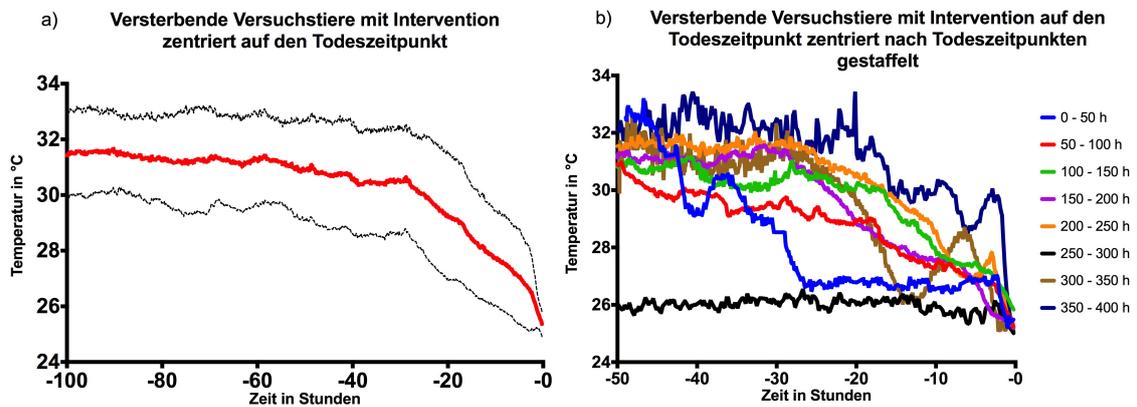
Teilabbildungen b) und c) zeigen den subsummierten Verlauf aller antibiotisch behandelten Tiere. Hierbei zeigt Abb. 17b) die ersten 72 Stunden und Abb. 17c) den gesamten Zeitverlauf. Die mit antibiotischer Behandlung behandelten Tiere gehen mit einer Temperatur von  $30,9\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95 %) in den Versuch. Innerhalb der ersten drei Stunden zeigt sich eine tendenzielle Temperaturerhöhung auf  $31,2\text{ °C} \pm 0,4\text{ K}$  (CI: 95 %). Danach fällt die Temperatur auf  $29,9\text{ °C} \pm 1,7\text{ K}$  (CI: 95 %) zum Zeitpunkt 10 Stunden p. i. ab, wobei eine große interindividuelle Schwankung zwischen  $26,4\text{ °C}$  und  $32,5\text{ °C}$  vorliegt. Im weiteren Verlauf erholen sich die Tiere mutmaßlich durch die antibiotische Behandlung auf  $31,3\text{ °C} \pm 1,6\text{ K}$  (CI: 95 %) zur Stunde 20 nach Versuchsbeginn. Danach wird die interindividuelle Schwankung so groß, dass eine generelle Auswertung nicht sinnvoll ist.



**Abbildung 18:** Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie, gemessen mit AUGUR 2.0.

Teilabbildungen a) und b) zeigen dieselbe Darstellung wie bei 17b) und 17c), jedoch diesmal nach den Versterbezeitpunkten gestaffelt. Die verschiedenen Untergruppen unterscheiden sich nicht eindeutig in der Kinetik der ersten Stunden nach Sepsisinduktion. Vielmehr kann lediglich der zweite Temperaturabfall unterhalb von 29 °C als eindeutiges Kriterium für das nahende Versterben zur Prognose herangezogen werden.

Tieren verläuft. Dies wird durch die durchgehend höhere Standardabweichung verdeutlicht. Im Detail zeigen die Tiere 30 Stunden vor dem Versterben eine Temperatur von  $30,5\text{ °C} \pm 1,8\text{ K}$  (CI: 95 %), 20 Stunden prä mortal  $29,3\text{ °C} \pm 2,3\text{ K}$  (CI: 95 %), 10 Stunden prä mortal  $27,7\text{ °C} \pm 1,7\text{ K}$  (CI: 95 %) und 5 Stunden prä mortal  $27,0\text{ °C} \pm 1,7\text{ K}$  (CI: 95 %). Erst direkt vor dem Versterben wird die interindividuelle Streuung wieder deutlich geringer mit  $25,4\text{ °C} \pm 0,5\text{ K}$  (CI: 95 %).



**Abbildung 19:** Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie, gemessen mit AUGUR 2.0.

Teilabbildungen a) und b) zeigen die letzten Stunden des Versuches, indem die Versuchstiere auf ihren Versterbezeitpunkt zentriert wurden. Abbildung a) zeigt alle Tiere, Abbildung b) zeigt die Darstellung nach Todeszeitpunkten gestaffelt. Hierbei zeigt sich in Abb. a), dass die Kinetik vor dem Tod sehr stringent verläuft, jedoch weniger uniform (höhere Standardabweichung) und unter Einschluss der atypischen Todesverläufe unter antibiotischer Therapie auch ohne eindeutigen Temperaturanstieg vor dem Tod. Im Detail zeigen die Tiere 30 Stunden vor dem Versterben eine Temperatur von  $30,5^{\circ}\text{C} \pm 1,8\text{K}$  (CI: 95%), 20 Stunden prä mortal  $29,3^{\circ}\text{C} \pm 2,3\text{K}$  (CI: 95%), 10 Stunden prä mortal  $27,7^{\circ}\text{C} \pm 1,7\text{K}$  (CI: 95%) und 5 Stunden prä mortal  $27,0^{\circ}\text{C} \pm 1,7\text{K}$  (CI: 95%). Erst direkt vor dem Versterben wird die interindividuelle Streuung wieder deutlich geringer mit  $25,4^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{K}$  (CI: 95%).

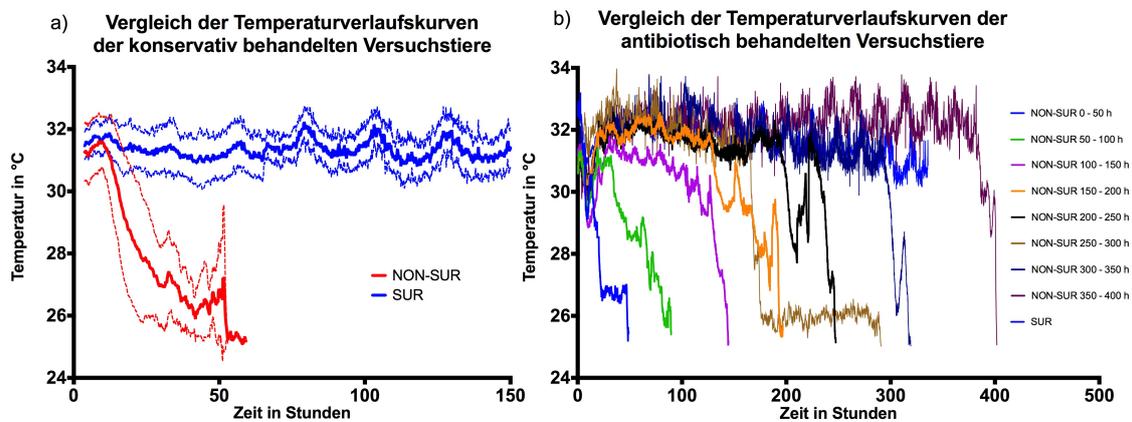
In Teilabbildung b), wo die Abb. 19a) nach Todeszeitpunkten aufgeschlüsselt ist, zeigt sich, dass die Verläufe deutlich multiformer sind. Es kommt nur noch bei einigen Untergruppen zu einem kurzen Wiederanstieg der Körperoberflächentemperatur vor dem Tod, wobei dieser häufig auch nur sehr kurz ausgeprägt ist. In mehreren Untergruppen kommt es zu einem protrahierten Verlauf, in dem Tiere sehr zügig auf ca.  $26,0^{\circ}\text{C}$  fallen und sich dort aber für viele Stunden, sogar Tage auf diesem niedrigen Niveau halten. Bei diesen Tieren ist auch die Lokomotion dementsprechend eingeschränkt gewesen.

#### 4.4 Vergleich zwischen den überlebenden und versterbenden Tieren eines Interventionsarmes

Bei der Gegenüberstellung der Temperaturverlaufskurven der überlebenden und versterbenden Versuchstiere eines Interventionsarmes (Abb. 20) werden einige Aspekte der vorherigen Beschreibungen verdeutlicht.

In der Gruppe der konservativ behandelten Versuchstiere (nur Infusionstherapie) verlaufen die Temperaturkurven nur bis Versuchsstunde 10 parallel, danach beginnt bei den versterbenden Tieren die vorbeschriebene Abwärtskinetik, welche sich über alle Tiere mit relativ kleiner Standardabweichung beschreiben lässt. Die überlebenden Versuchstiere erlangen ein stabiles Niveau sowie den zirkadianen Rhythmus und verlaufen ebenfalls mit geringer Schwankungsbreite bis zum Versuchsende.

Bei den Versuchstieren mit der antibiotischen Behandlung zeigt sich ein deutlich heterogeneres Bild. Um diese Heterogenität abbilden zu können, wurden in Abb. 20b) die zeitlichen Untergruppen des Versterbezeitraumes zur Darstellung gebracht, da eine Analyse sonst nicht zielführend gewesen wäre (siehe Kapitel 4.3.2 sowie Abb. 17 und 18). Sowohl überlebende wie auch versterbende Versuchstiere zeigen initial einen Temperaturabfall. Die Überlebenden erlangen analog zu den konservativ behandelten Tieren ein stabiles Niveau sowie einen zirkadianen Rhythmus. Eindrücklich ist jedoch die Situation bei den versterbenden Tieren. Diese haben nach einer initialen mehr oder weniger lang ausgeprägten Erholungsphase einen zweiten ausgeprägten Temperatureinbruch, welcher je nach Subgruppe eher kontinuierlich oder eher rapide zu beschreiben ist. Während die am frühesten versterbenden Subgruppen einen sehr rapiden Temperatureinbruch bieten, fallen die zwischen Stunde 100 und 200 versterbenden Tiere eher kontinuierlich ab, um dann unterhalb von 29 °C rapide einzubrechen. Bei den Versuchstieren, welche innerhalb der Versterbenden am längsten überleben, zeigt sich, dass diese über sehr lange Zeit nicht von den überlebenden Tieren zu differenzieren sind. Zu einem willkürlichen Zeitpunkt im Laufe der postakuten Phase der Sepsis scheint es jedoch zu erneuten Akutereignissen zu kommen, wodurch diese Tiere plötzlich und für die Operatoren unerwartet versterben.



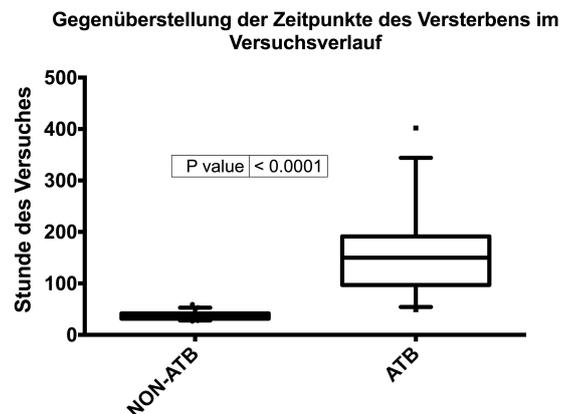
**Abbildung 20:** Vergleich der Temperaturverlaufskurven von konservativ und antibiotisch behandelten Versuchstieren.

In beiden Teilabbildungen ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden, gemessen mit AUGUR 2.0.

Teilabbildung a) zeigt hierbei den Vergleich der Temperaturverlaufskurven zwischen den überlebenden und versterbenden Versuchstieren in der konservativ behandelten Gruppe. SUR und die NON-SUR unterscheiden sich bis Stunde 10 des Versuches kaum, dann jedoch brechen die NON-SUR mit der Temperatur wie in vorherigen Abbildungen beschrieben ein und differieren deutlich sowohl im Mittelwert (durchgezogene dicke Linie) als auch in der Standardabweichung (95% CI) (gestrichelte dünnere Linien). Teilabbildung b) zeigt den Vergleich der Temperaturverlaufskurven zwischen den überlebenden und versterbenden Versuchstieren in der antibiotisch behandelten Gruppe. Die NON-SUR wurden jedoch auf Grund ihres heterogenen Verlaufs in Subgruppen nach ihrem jeweiligen Versterbezeitraum eingeteilt. Initial zeigt sich, dass alle dargestellten Untergruppen (wie vorbeschrieben) initial zunächst einen Temperaturabfall haben, von dem die Versuchstiere jedoch wieder annähernd auf das Ausgangsniveau ansteigen. Danach stabilisieren sich die SUR und zeigen einen ausgeprägten zirkadianen Rhythmus bis zum Ende des Experimentes. Die NON-SUR zeigen nach der o.g. Stabilisierung zunächst über einen differenten Zeitraum einen analogen Verlauf zu den SUR. Danach beginnen die NON-SUR jedoch mit der Temperatur ein zweites Mal abzufallen, was dann ein Hinweis auf das Versterben der Tiere darstellt. Dieser zweite Temperaturabfall kann eher rapide oder auch kontinuierlich ausfallen. Die zu Beginn versterbenden Tiere weisen eine sehr rapide Kinetik auf, ebenso wie die am Versuchsende in der postakuten Phase der Sepsis versterbenden Tiere. Diese sterben meist in sehr kurzer Zeit, ohne dass für die Operatoren irgendein klinischer Verdacht auf eine erneute Verschlechterung des Gesundheitszustandes bestanden hätte.

#### 4.5 Vergleich zwischen progredienter und antibiotisch behandelter Sepsis

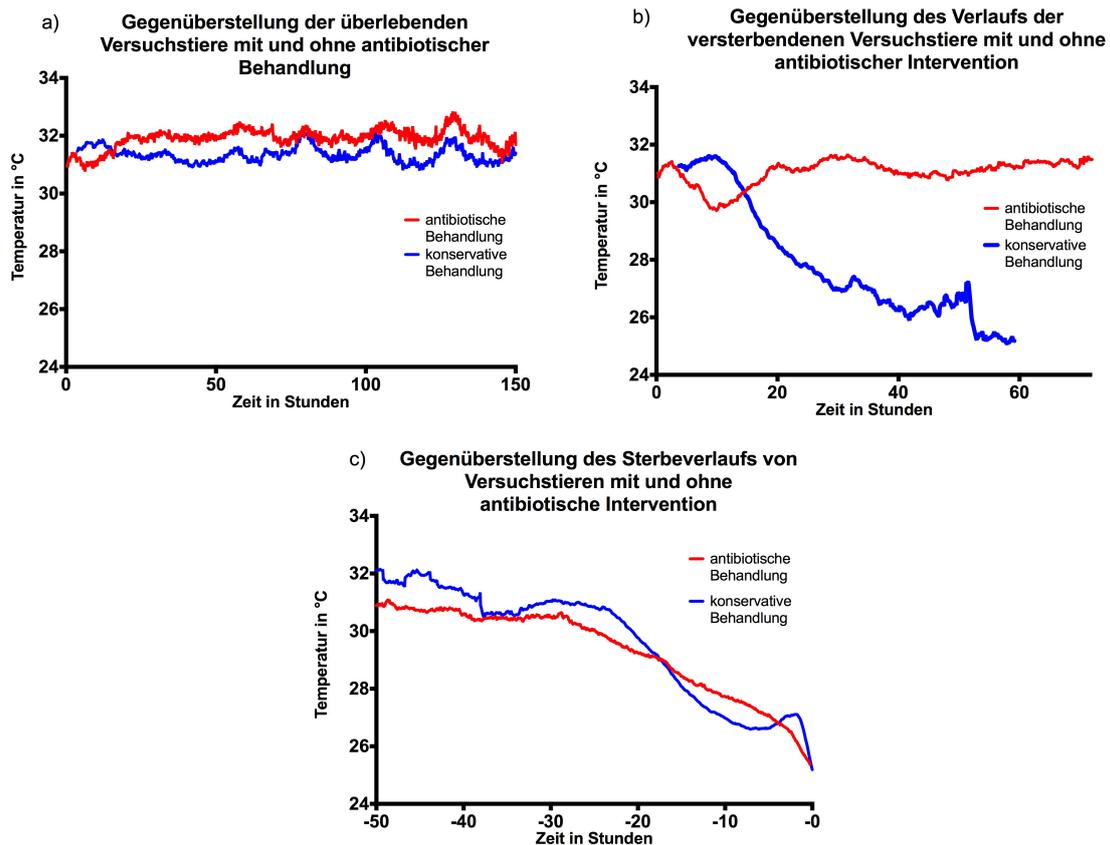
Vergleicht man die unbehandelte mit der antibiotisch behandelten Sepsis bei gleichen Versuchsausgängen direkt untereinander (Abb. 21 und 22) gibt es einige Gemeinsamkeiten, aber auch eindeutige Unterschiede, welche diese beiden Subgruppen charakterisieren. In der Analyse der überlebenden Versuchstiere zeigen neben einer anfänglichen Divergenz (konservativ behandelte Tiere steigen eher mit der Temperatur, während antibiotisch behandelte Tiere initial abfallen) einen sehr parallelen Verlauf und bilden im späteren Versuchsstadium einen zirkadianen Rhythmus aus.



**Abbildung 21:** Vergleich der überlebenden und versterbenden Versuchstiere mit und ohne antibiotische Therapie.

Diese Abbildung zeigt die Versterbezeitpunkte, wobei sichtbar wird, dass sich diese statistisch signifikant voneinander unterscheiden ((37,8 h vs. 159,6 h [CI 95 % 94,3 - 149,4],  $p < 0,0001$ ).

Die versterbenden Versuchstiere bleiben wie die konservativ behandelten Tiere initial für ca. 10 Stunden stabil, fallen dann aber kontinuierlich ab und versterben im Vergleich zu den antibiotisch behandelten Tieren signifikant früher (37,8 h vs. 159,6 h [CI 95 % 94,3 - 149,4],  $p < 0,0001$ ). Jedoch unterscheidet sich die Sterbekinetik nicht wesentlich. Das heißt, auf Grund der vermehrten Zahl an heterogenen Verläufen gibt es zwar eine größere Zahl an atypischen Temperaturverlaufskurven (z. B. Temperaturabfall und Stabilisierung bei 26 °C für viele Stunden), jedoch bleibt im Mittel die Kinetik des Abfalls vergleichbar. Das beschriebene Wiederansteigen vor dem Tod ist bei vielen Tieren nachweisbar, auch wenn dies durch die atypischen Verläufe in der Zusammenschau insgesamt überdeckt wird.



**Abbildung 22:** Vergleich der überlebenden und versterbenden Versuchstiere mit und ohne antibiotische Therapie.

In diesen drei Teilabbildungen ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden, gemessen mit AUGUR 2.0.

Teilabbildung a) zeigt die Temperaturverlaufskurven der SUR mit und ohne antibiotische Behandlung. Initial ist der Verlauf divergent, d. h. die konservativ behandelten Tiere haben eher eine Tendenz zum Temperaturanstieg, währenddessen die antibiotisch behandelten Tiere einen initialen Abfall präsentieren. Im Verlauf stellen sich beide Verlaufskurven jedoch parallel mit der späteren Ausprägung eines zirkadianen Rhythmus dar.

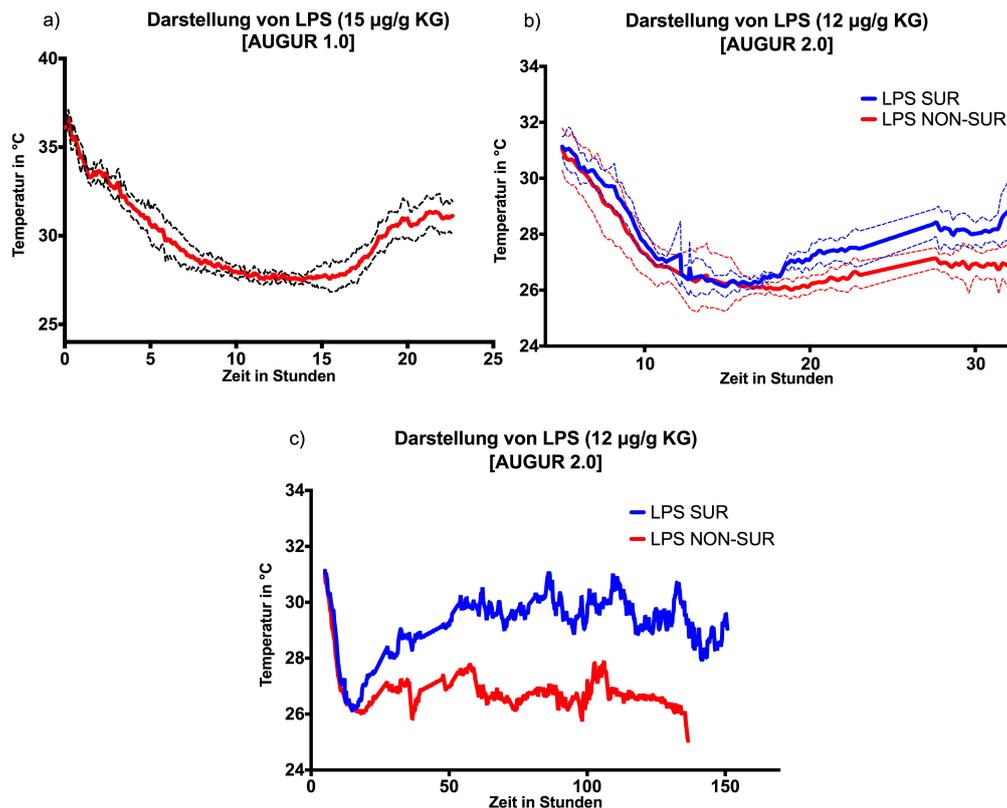
Teilabbildung b) zeigt die Temperaturverlaufskurven für die NON-SUR in den ersten 60 Stunden p. i. Hier zeigt sich, dass auch die NON-SUR bei den antibiotisch behandelten Tieren zunächst einen initialen Temperaturabfall aufweisen, von dem sie sich jedoch wieder auf ein stabiles Niveau in der Nähe der Ausgangstemperatur erholen. Die konservativ behandelten Tiere bleiben hingegen während der ersten 10 Versuchstunden stabil und fallen im weiteren Verlauf dann kontinuierlich ab, bis sie im Mittel deutlich vor den antibiotisch behandelten Tieren versterben. Teilabbildung c) zeigt die Kinetik des Versterbens in der Auftragung auf den Todeszeitpunkt zentriert. Beide Verlaufskurven unterscheiden sich nicht deutlich voneinander, auch wenn die Anzahl an heterogenen und atypischen Verläufen einige Besonderheiten wie das Wiederansteigen vor dem Tod kaschiert. Nichtsdestotrotz sind auch diese Kinetiken hochreproduzierbar wieder anzutreffen, werden jedoch von Verlaufskurven, bei denen sich Tiere über viele Stunden stabil auf ca. 26 °C halten, überdeckt.

## 4.6 Abgrenzung zu nichtinfektiösen Entitäten

### 4.6.1 Septische Wirtsreaktion durch Lipopolysaccharid

Es wurden 14 Tiere in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen und zwei unterschiedlichen LPS-Dosen (Abb. 23) untersucht.

Die erste Versuchsreihe wurde mit dem AUGUR 1.0 durchgeführt, weshalb die absoluten Temperaturangaben wie in Kapitel 3.4 beschrieben von den sonst dargestellten Temperaturwerten leicht differieren. Die Versuchstiere ( $n = 4$ ) wurden mit  $15 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$  KG LPS behandelt. Die in Kapitel 1.2 beschriebene Uniformität der Immunreaktion wird in Abb. 23 deutlich. Die Versuchstiere hatten zu Versuchsbeginn eine Körperoberflächentemperatur von ca.  $36,7^\circ\text{C}$ , sanken dann im Verlauf von 10 Stunden auf  $28,1^\circ\text{C} \pm 0,2\text{ K}$  (CI: 95%), nach 15 Stunden auf  $27,7^\circ\text{C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95%). Danach erholen sich die Tiere bereits nach 20 Stunden p. i. auf  $30,8^\circ\text{C} \pm 0,9\text{ K}$  (CI: 95%). Die zweite Versuchsreihe wurde mit dem AUGUR 2.0 sowie ( $n = 10$ ) mit  $12 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$  KG LPS durchgeführt. Diese Versuchstiere haben 5 h p.i. eine Körperoberflächentemperatur von  $30,7^\circ\text{C} \pm 0,7\text{ K}$  (CI: 95%). Sie fallen dann bis Stunde 15 h p. i. auf  $26,2^\circ\text{C} \pm 0,7\text{ K}$  (CI: 95%). Auch die Versuchstiere dieser Versuchsreihe erholen sich dann je nach Ausgang unterschiedlich. Die überlebenden Tiere steigen bis Versuchsstunde 50 wieder auf ein Niveau von ca.  $30,5^\circ\text{C}$  und entwickeln einen stabilen zirkadianen Rhythmus. Die versterbenden Versuchstiere steigen jedoch deutlich flacher an, erreichen die Ausgangstemperatur im Gegensatz zu den antibiotisch behandelten Versuchstieren bei polymikrobieller Infektion nicht mehr und versterben im weiteren Verlauf.



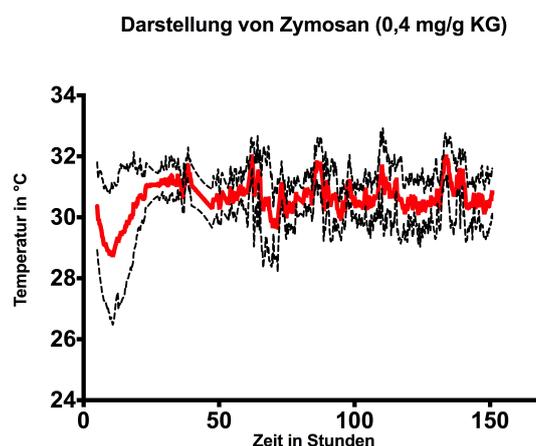
**Abbildung 23:** Darstellung der septischen Wirtsreaktion unter Einsatz von Lipopolysaccharid. In allen drei Teilabbildungen ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. In Teilabbildung a) ist die mit dem AUGUR 1.0 gemessene Körperoberflächentemperatur dargestellt, die wie in Kapitel 4.4 beschrieben im Absolutbetrag größere Schwankungen abbildet. In diesem Versuchsteil ( $n = 4$ ) wurden die Versuchstiere mit  $15 \mu\text{g g}^{-1} \text{ KG}$  LPS behandelt. Die Uniformität der Wirtsreaktion tritt hervor und ist im Vergleich zur polymikrobiellen Infektion deutlich höher, das heißt die interindividuellen Schwankungen im Sinne des Konfidenzintervalls geringer. Die Versuchstiere begannen mit einer Körperoberflächentemperatur von ca.  $36,7 \text{ }^\circ\text{C}$ , sanken dann im Verlauf von 10 Stunden auf  $28,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ K}$  (CI: 95 %), nach 15 Stunden auf  $27,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,6 \text{ K}$  (CI: 95 %). Danach erholen sich die Tiere bereits nach 20 Stunden p. i. auf  $30,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,9 \text{ K}$  (CI: 95 %). In Teilabbildungen b) und c) ist die zweite Versuchsreihe ( $n = 10$ ) dargestellt. Hierbei wurden den Versuchstieren  $12 \mu\text{g g}^{-1} \text{ KG}$  LPS injiziert und der Temperaturverlauf mit dem AUGUR 2.0 ausgewertet. Teilabbildung b) zeigt aus diesem Versuch die ersten 30 Stunden, welche zur detaillierten Analyse und zum Vergleich mit dem Vorversuch extrahiert wurden. Die Versuchstiere haben 5 h p.i. eine Körperoberflächentemperatur von  $30,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,7 \text{ K}$  (CI: 95 %). Sie fallen dann bis Stunde 15 h p. i. auf  $26,2 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,7 \text{ K}$  (CI: 95 %). Der vollständige Verlauf des Versuches ist in Teilabbildung c) abgebildet. Nach der zuvor beschriebenen Initialphase dieser Versuchsreihe erholen sich die Versuchstiere dann je nach Ausgang unterschiedlich. Die überlebenden Tiere steigen bis Versuchsstunde 50 wieder auf ein Niveau von ca.  $30,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und entwickeln einen stabilen zirkadianen Rhythmus. Die versterbenden Versuchstiere steigen jedoch deutlich flacher an, erreichen die Ausgangstemperatur im Gegensatz zu den antibiotisch behandelten Tieren bei polymikrobieller Infektion nicht mehr und versterben im weiteren Verlauf.

#### 4.6.2 Septische Wirtsreaktion durch Zymosan

Es wurde eine Versuchsreihe mit 10 Tieren und  $0,4 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$  KG Zymosan durchgeführt (Abb. 24). Während der Versuchslaufzeit ist keines der behandelten Versuchstiere verstorben.

Die schwächere Immunantwort auf Zymosan wird auch im Verlauf der Streuungsbreite sowie der Körperoberflächentemperatur deutlich: Initial fällt die Temperatur innerhalb der ersten 10 Versuchsstunden auf  $28,8 \text{ °C} \pm 2,1 \text{ K}$  (CI: 95 %), wobei simultan auch die Standardabweichung zunimmt. Danach steigt die Temperatur bis Versuchsstunde 25 wieder auf  $31,1 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ K}$  (CI: 95 %) und der Schwankungsbereich wird ebenfalls wieder deutlich geringer. Im Anschluss an diese Akutphase zeigen die Tiere einen stabilen zirkadianen Rhythmus analog zu nicht behandelten Versuchstieren.

Vergleichend mit dem LPS-Modell fällt auf, dass der initiale Abfall der Temperatur zwar ebenfalls prompt auf  $28,8 \text{ °C} \pm 2,1 \text{ K}$  (CI: 95 %) erfolgt, jedoch keinesfalls so drastisch geschieht wie bei LPS ( $26,2 \text{ °C} \pm 0,7 \text{ K}$  (CI: 95 %)).



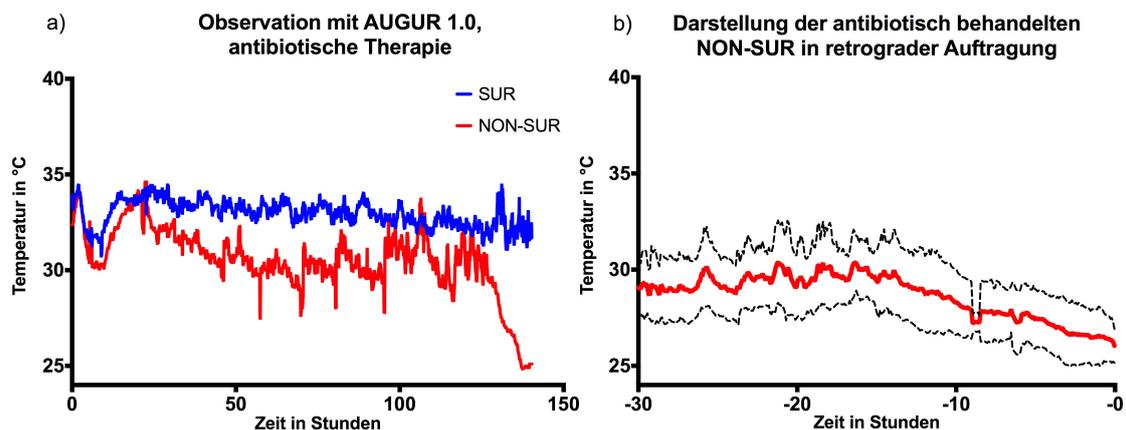
**Abbildung 24:** Darstellung der septischen Wirtsreaktion bei Einsatz von Zymosan. In dieser Abbildung ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, so dass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. Die schwächere Immunantwort im Vergleich zum LPS-Modell wird im Verlauf der Streuungsbreite sowie der Körperoberflächentemperatur deutlich: Initial fällt die Temperatur innerhalb der ersten 10 Versuchsstunden auf  $28,8 \text{ °C} \pm 2,1 \text{ K}$  (CI: 95 %), wobei simultan auch die Standardabweichung zunimmt. Danach steigt die Temperatur bis Versuchsstunde 25 wieder auf  $31,1 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ K}$  (CI: 95 %) und der Schwankungsbereich wird ebenfalls wieder deutlich geringer. Im Anschluss an diese Akutphase zeigen die Tiere einen stabilen zirkadianen Rhythmus analog zu nicht behandelten Versuchstieren.

## 4.7 Vergleich verschiedener Versuchsmodelle

### 4.7.1 Versuche mit antibiotischer Therapie mit AUGUR 1.0

Mit der ersten Version des Thermographiesystems wurden fünf Versuchsreihen a 4 Tiere mit antibiotischer Therapie observiert. Hierbei wurden  $3,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces injiziert und die Versuchstiere wurden antibiotisch nach 6 sowie je weitere 12 h post-PCI mit  $300 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Meropenem in NaCl-Lösung gelöst behandelt. Die Auswertung erfolgte mit AUGUR 1.0 (Abb. 25).

Sowohl die SUR als auch die NON-SUR zeigen wie vorbeschrieben einen initialen Temperaturabfall innerhalb der ersten 12 Versuchsstunden, mit einem Tiefpunkt nach 9 Stunden, also 3 Stunden nach der ersten Antibiotikagabe. Die SUR erholen sich nach 15 Stunden bzw. 9 Stunden nach der ersten Antibiotikagabe auf  $33,7^{\circ}\text{C}$  (und somit den Ausgangswert) und zeigen wieder zirkadianen Rhythmus, welcher sich in diesem Versuch jedoch doppelgipflig darstellt und alle 12 Stunden ein Maximum aufweist. Bei den NON-SUR zeigt die Applikation des Antibiotikums nicht die gewünschte Wirkung und die Tiere versterben über einen langen Zeitverlauf sehr heterogen, was die artefaktüberlagerte Verlaufskurve der NON-SUR erklärt. Die Verlaufskurve der letzten 30 Stunden auf den Todeszeitpunkt zentriert zeigt bei den NON-SUR dieselbe Kinetik wie bereits in Kapitel 4.3.2 sowie Abb. 19 dargestellt.



**Abbildung 25:** Darstellung der antibiotisch behandelten Versuchstiere, observiert mit AUGUR 1.0.

In beiden Teilabbildungen ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. Die Auswertung erfolgte mittels der Software von FLIR.

In Teilabbildung a) zeigen sowohl SUR wie auch NON-SUR wie vorbeschrieben einen initialen Temperaturabfall innerhalb der ersten 12 Versuchsstunden, mit einem Tiefpunkt nach 9 Stunden. Die SUR erholen sich nach 15 Stunden bzw. 9 Stunden nach der ersten Antibiotikagabe auf 33,7 °C (und somit den Ausgangswert) und zeigen wieder zirkadianen Rhythmus, welcher sich in diesem Versuch jedoch doppelgipflig darstellt und alle 12 Stunden ein Maximum aufweist.

Die NON-SUR zeigen zwar initial eine ähnliche Temperaturkinetik wie die SUR, was den Wiederanstieg nach Applikation des Antibiotikums betrifft, versterben dann jedoch über einen langen Zeitverlauf sehr heterogen, was die artefaktüberlagerte Verlaufskurve der NON-SUR erklärt.

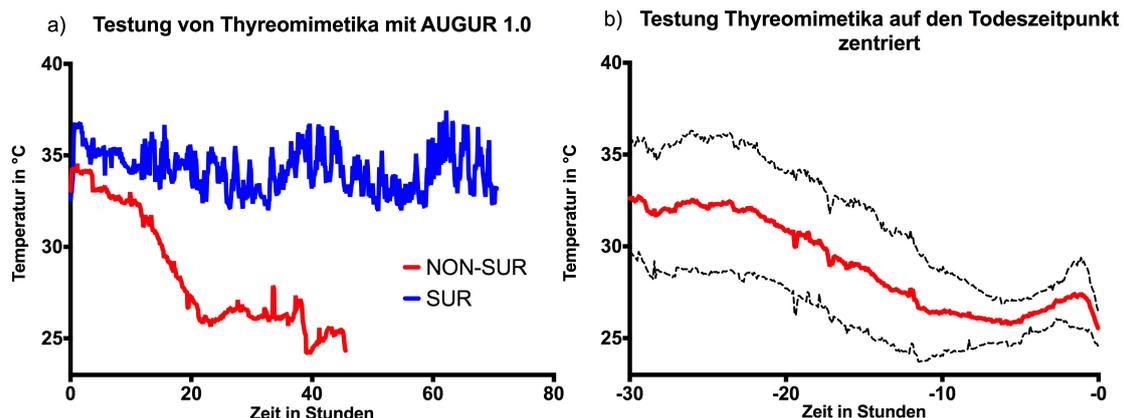
Die Verlaufskurve der letzten 30 Stunden auf den Todeszeitpunkt zentriert zeigt bei den NON-SUR dieselbe geradlinige Kinetik wie bereits in Kapitel 4.3.2 sowie Abb. 19 dargestellt.

#### 4.7.2 Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 1.0

Bei den hier observierten Versuchen handelt es sich um zwei Versuchsreihen, wobei je 4 Tiere beobachtet wurden. Thematisch handelte es sich hier um Versuche zur Testung von verschiedenen Thyreomimetika (siehe Kapitel 4.7.6). Es wurden  $1,25 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces per PCI injiziert und im Anschluss alle 12 Stunden  $15 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG NaCl-Lösung zur Volumensubstitution. Durchgeführt wurden die Versuche mit AUGUR 1.0.

Analog zu Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 sowie Abb. 11 bis 14 stellen sich die Oberflächentemperaturverläufe dar. Die überlebenden Versuchstiere zeigen auch postinterventionell ein stabiles Temperaturniveau und haben einen stabilen zirkadianen Rhythmus.

Die versterbenden Tiere versterben sehr früh innerhalb der ersten zwei Tag post infectionem. Sobald die Versuchstiere begonnen haben, an Temperatur zu verlieren, sinken sie sehr stetig bis auf  $25,7^{\circ}\text{C}$ . Danach beginnt der bereits vorbeschriebene letztmalige Temperaturanstieg auf  $27,4^{\circ}\text{C}$ , wonach sich der letzte Temperaturabfall anschließt, in welchem die Tiere versterben (siehe Abb. 26).



**Abbildung 26:** Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 1.0 ohne antibiotische Therapie.

In beiden Teilabbildungen ist die Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$  gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. Die SUR zeigen auch postinterventionell ein stabiles Temperaturniveau und haben einen zirkadianen Rhythmus.

Die NON-SUR versterben sehr früh innerhalb der ersten zwei Tag post infectionem. Sobald die Versuchstiere begonnen haben, an Temperatur zu verlieren, sinken sie sehr stetig bis auf  $25,7^{\circ}\text{C}$ . Danach beginnt der bereits vorbeschriebene letztmalige Temperaturanstieg auf  $27,4^{\circ}\text{C}$ , wonach sich der letzte Temperaturabfall anschließt, in welchem die Tiere versterben.

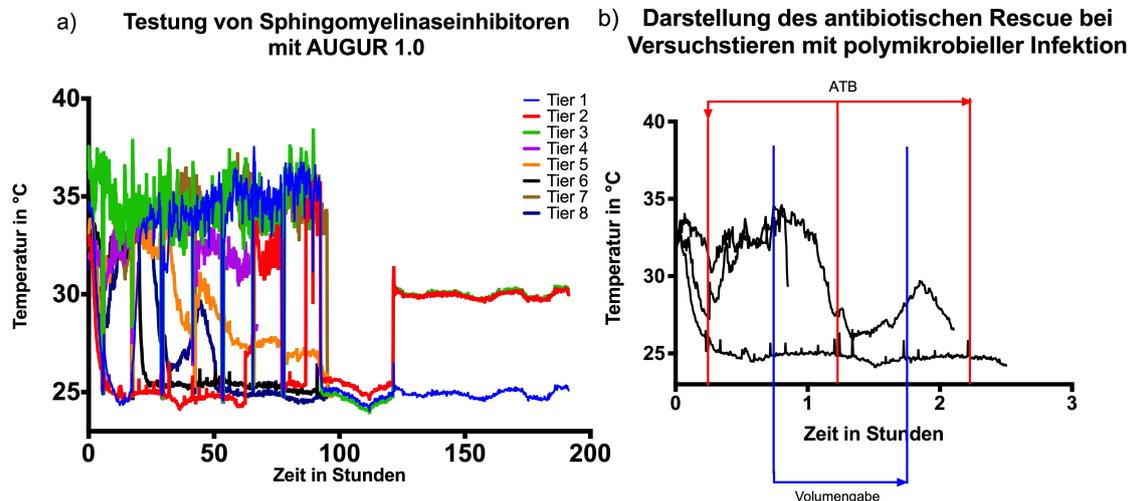
### 4.7.3 Testung von Sphingomyelinaseinhibitoren (FIASMA)

Bei den hier observierten Versuchen handelt es sich um zwei Versuchsreihen, wobei je 4 Tiere beobachtet wurden. Die Observation erfolgte mit AUGUR 1.0.

Die polymikrobielle Infektion wurde mit  $3 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces induziert, anschließend wurden 6 h post-PCI eine antibiotische Therapie mit 300  $\mu\text{g}$  Meropenem sowie dem Sphingomyelinaseinhibitor Desipramin verabreicht. Im Anschluss wurden alle 12 Stunden die antibiotische Therapie, gelöst in  $25 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG NaCl fortgeführt.

Desipramin ist ein trizyklisches Antidepressivum, welches gleichzeitig auf Grund seiner chemischen Struktur der Gruppe der sauren Sphingomyelinaseinhibitoren (FIASMA) gehört. Die Spingomyelinase ist beteiligt an der Regulation von Zellwachstum und Apoptose. Eine Hypothese besagt, dass die Fehlregulation dieses Enzyms schwerwiegende Krankheitsverläufe sowie am Organversagen im Verlauf des septischen Krankheitsbildes beteiligt ist. Die FIASMA sind eine pharmakologisch heterogene Gruppe an Arzneimitteln, welche chemisch lipophil und im pH-Wert schwach basisch sowie mindestens ein protonierbares Stickstoff-Atom besitzen.

Auf Grund verschiedener Fehler bei der Bedienung des Computersystems sowie Unregelmäßigkeiten beim Einstellen der Versuchstiere nach den Interventionen sind die Daten in der Zusammenschau insgesamt wenig reliabel. Wenn die Artefakte herausgerechnet werden, zeigen sich im Allgemeinen wieder die bereits vorbeschriebenen typischen Temperaturverläufe von antibiotisch behandelten Versuchstieren. Für die drei am wenigsten artefaktbehafteten Versuchstiere ist der eindrucksvolle „rescue“ durch das Breitbandantibiotikum Meropenem dargestellt. An einem Tier zeigt sich dies, indem es fast bis auf Raumtemperatur absinkt und sich im Anschluss nach der Antibiotikagabe vollständig erholt (siehe Abb. 27).



**Abbildung 27:** Testung von Sphingomyelinaseinhibitoren.

In beiden Teilabbildungen ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. Die Auswertung erfolgte mit AUGUR 1.0.

Teilabbildung a) zeigt den Oberflächentemperaturverlauf der einzelnen Versuchstiere, welche in diesem Versuch observiert wurden. Hierbei zeigen sich zahlreiche Unregelmäßigkeiten, auf Grund von Bedienfehlern des ausführenden Operators, sodass diese Versuche keinen Eingang in weitere statistische Untersuchungen erhielten.

Beispielsweise wurde für Interventionen das Kameramodul nicht ausgeschaltet oder beim Wiedereinsetzen die Versuchstiere in den falschen Käfigen wieder eingesetzt.

Teilabbildung b) zeigt die Oberflächentemperaturverlaufskurven, welche um die o. g. Artefakte bereinigt wurden. Danach wurden die Zeitpunkte der Antibiotika- sowie Volumengabe eingetragen. Hierbei fällt auf, dass die initiale Gabe von Antibiotika ca. 6 Stunden p. i. mit dem negativen Peak des ersten Temperaturabfalls übereinfällt. Im Anschluss erholen sich die meisten Versuchstiere, was bei Versuchstieren ohne Antibiose nach dem Einsetzen des Temperaturabfalls nicht zu beobachten war. Dies zeigte sich auch bei einem Versuchstier, bei welchem die Körpertemperatur bis knapp über Raumtemperatur abfällt, äußerlich moribund und die Lokomotion kaum erfassbar ist, um sich nach der ersten Antibiotikagabe vollständig zu erholen und sich mobil bis an das Versuchsende durch den Käfig zu bewegen.

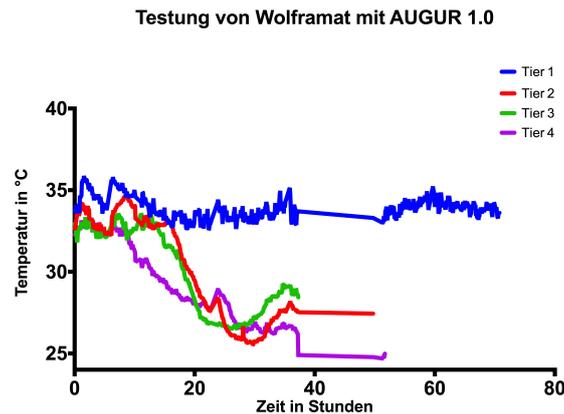
#### 4.7.4 Testung von Wolframat

Bei den hier observierten Versuchen handelt es sich um eine Versuchsreihe, wobei 4 Tiere mit AUGUR 1.0 beobachtet wurden.

Die polymikrobielle Infektion wurde per PCI mit  $3,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces induziert. Zwei der Tiere erhielten neben der antibiotischen Behandlung mit Meropenem und Volumensubstitution eine Therapie mit Wolframat.

Wolfram ist ein Schwermetall, welches chemisch zu den Übergangsmetallen zählt. Die Salze des Wolfram werden als Wolframate bezeichnet. Natriumwolframat hat immunmodulatorische Wirkungen indem es die Immunantwort des Wirts unterdrückt und somit die proinflammatorische Phase der Sepsis im Tierversuch abschwächen kann. Im Tierexperiment hat dies zu einer verminderten Immunantwort mit Hinweisen auf ein vermindertes Auftreten von Organversagen in der frühen Phase der Sepsis geführt (Osterburg et al. 2014).

Die hier observierten 4 Versuchstiere sind eine zu kleine Gruppe, um in eine gerichtete Analyse bezüglich der Wirksamkeit oder Unterschiedlichkeit des eingesetzten Wolframates zu berichten. Bezüglich der Oberflächentemperaturüberwachung ist zu beobachten, dass die Versuchstiere initial nicht so stark mit der Temperatur abfallen, wie dies bei einer Behandlung mit  $3,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces zu erwarten gewesen wäre. Der weitere Verlauf gestaltet sich jedoch wie bereits zuvor beschrieben. Das überlebende Versuchstier hält die Oberflächentemperatur im gesamten Versuchsablauf aufrecht. Dass keine ausgeprägte zirkadiane Rhythmik zu beobachten ist, liegt an der verwendeten Messmethodik (AUGUR 1.0), mit der lediglich die Höchsttemperatur ausgewertet werden konnte. Die versterbenden Versuchstiere zeigen die typische Kinetik des zweiten Temperaturabfalls mit zunächst kontinuierlichem Absinken auf ein Basis-Niveau mit anschließendem Wiederanstieg und weiterem Temperaturabfall, in Folge dessen die Versuchstiere dann versterben (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Testung von Wolframmat.

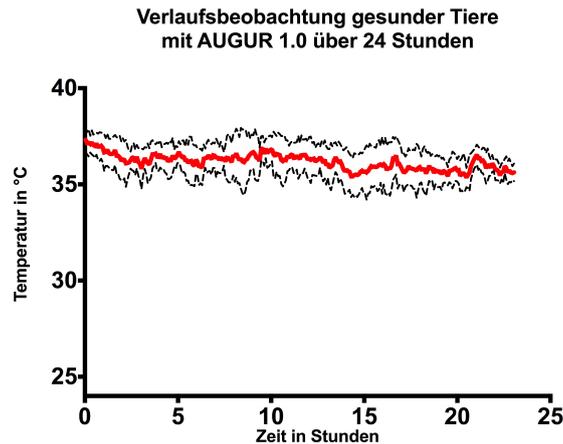
In dieser Abbildung ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, so dass eine Oberflächentemperaturverlaufskurve abgebildet wird. Die Observation erfolgte mit AUGUR 1.0.

Die Versuchstiere fallen initial nicht so deutlich mit der Temperatur ab, wie dies bei einer Behandlung mit  $3,5 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  Faeces zu erwarten gewesen wäre. Der weitere Verlauf gestaltet sich in Analogie zu den vorherigen Versuchen. Das überlebende Versuchstier hält die Oberflächentemperatur im gesamten Versuchsablauf aufrecht. Die versterbenden Versuchstiere zeigen die typische Kinetik des zweiten Temperaturabfalls mit zunächst kontinuierlichem Auskühlen auf ein Basis-Niveau mit anschließendem Wiederanstieg und letztem Temperaturabfall, in Folge dessen die Versuchstiere dann versterben.

#### 4.7.5 Überwachung von gesunden Versuchstieren

Hierbei handelt es sich um 8 Versuchstiere, welche mit AUGUR 1.0 überwacht wurden (Abb. 29).

Hierbei wird im Vergleich zu der Observation von scheinbehandelten Versuchstieren mit AUGUR 2.0 (in Kapitel 4.1, Abb. 10) deutlich, wo die Unterschiede zwischen den beiden Software-/Detektions- und Auswertungsmethoden liegen. In der deskriptiven Analyse ist die zirkadiane Rhythmik nur schwerlich nachzuvollziehen bzw. nicht so eindrucksvoll ausgeprägt. Die Verlaufskurve zeigt bei gesunden Tieren einen deutlich horizontalen Verlauf, d. h. die detektierte Temperatur ändert sich im Verlauf des Versuches nur in einem engen Rahmen. Deutlicher wird dies bei der statistischen Auswertung. Während bei der automatisierten Auswertungsmethode mit AUGUR 2.0 die Temperatur im Mittel  $30,5 \text{ °C} \pm 0,6 \text{ K}$  (CI: 95 %) bei einem Schwankungsbereich von 2,9 K (29,1 - 32,0 °C) beträgt, wird diese bei der Auswertung mit AUGUR 1.0 mit  $36,2 \text{ °C} \pm 0,4 \text{ K}$  (CI: 95 %) bei einem Schwankungsbereich von 1,9 K (35,4 - 37,3 °C) gemessen. Die Unterschiede in der Messmethode sind in Kapitel 3.2 dargestellt.



**Abbildung 29:** Darstellung einer Verlaufsbeobachtung gesunder Tiere mit AUGUR 1.0. In dieser Abbildung ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass eine Oberflächentemperaturverlaufskurve abgebildet wird. Die zirkadiane Rhythmik ist wenn überhaupt nur schwach abgebildet. Die Verlaufskurve zeigt einen ausgeprägt horizontalen Verlauf, d. h. die detektierte Temperatur zeigt im Verlauf des Versuches keinen erkennbaren Trend. Deutlicher wird dies bei der statistischen Auswertung. Während bei der automatisierten Auswertungsmethode von AUGUR 2.0 die Temperatur im Mittel  $30,5\text{ °C} \pm 0,6\text{ K}$  (CI: 95%) bei einem Schwankungsbereich von 2,9 K (29,1 - 32,0 °C) beträgt, wird diese bei der Auswertung mit AUGUR 1.0 mit  $36,2\text{ °C} \pm 0,4\text{ K}$  (CI: 95%) bei einem Schwankungsbereich von 1,9 K (35,4 - 37,3 °C) gemessen.

#### 4.7.6 Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 2.0

Bei dieser Versuchsreihe wurden insgesamt 49 Tiere in zwei Versuchsreihen und 6 Subgruppen observiert.

Die polymikrobielle Infektion wurde mit  $1,25\frac{\text{ml}}{\text{g}}$  KG Faeces induziert. Die Subgruppen wurden jeweils entweder mit Natriumchlorid (NaCl), Dijodthyronin (T2), Trijodthyronin (T3), reverses Trijodthyronin (rT3), ein Thyreomimetika-Analogon (Ana) sowie dieses Analogon zusammen mit Trijodthyronin (AnaT3).

Die Annahme war, dass Thyreomimetika analog zu Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels beim Menschen auch im murinen Modell die Temperatur der Versuchstiere beeinflusst.

Die unterschiedlichen Thyreomimetika (Abb. 30) unterscheiden sich sowohl in der Mortalität als auch im gemittelten Temperaturverlauf, jedoch anders als in der Hypothese postuliert.

Die Annahme war, dass:

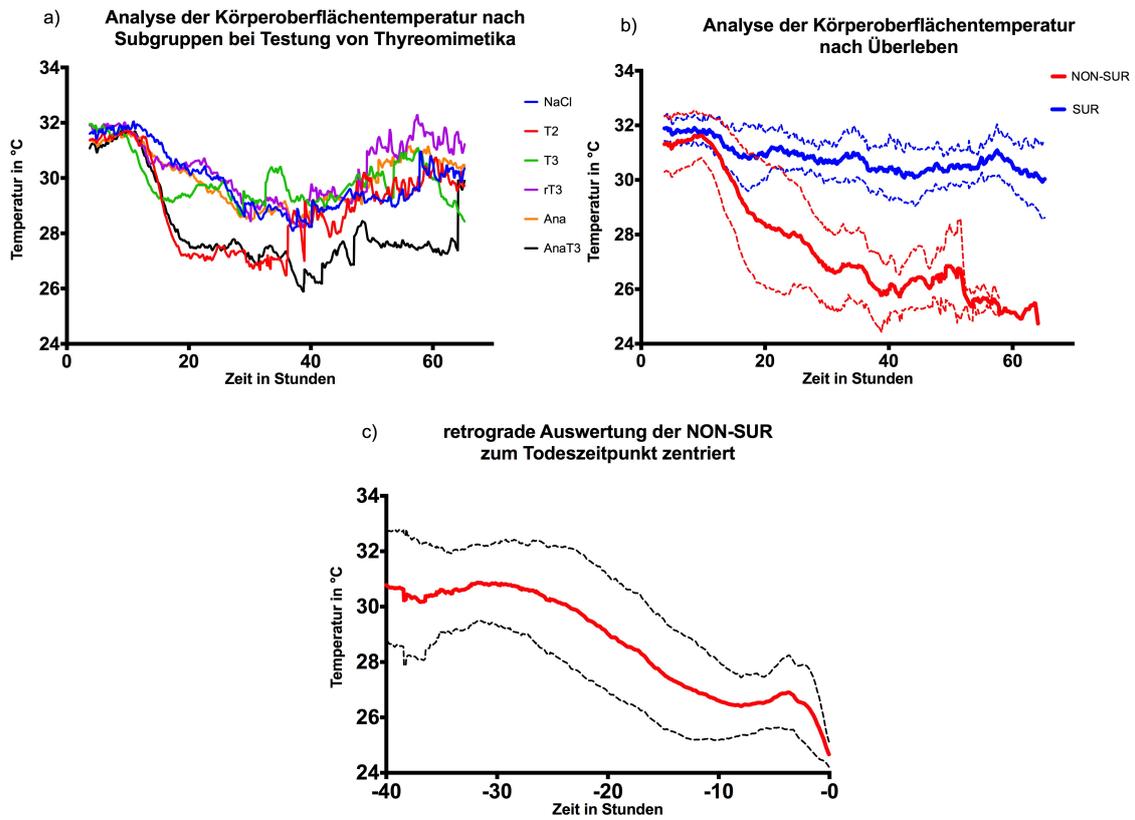
- NaCl die Temperatur der Tiere nicht beeinflusst, die Tiere im Mittel schneller auskühlen müssten und ein schlechteres Outcome haben.

- T2 als aktives Hormon, welches am TR- $\beta$ -Rezeptor agonistisch wirkt und somit die  $\beta$ -Rezeptoren des Myokards sensibler für Katecholamine macht und die Hypophyse stimuliert, was eine katabole Stoffwechsellage mit Steigerung der Körpertemperatur zur Folge haben müsste.
- T3 als ebenfalls aktives Hormon, welches regulär in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse gebildet wird mit den katabolen physiologischen Wirkungen.
- rT3 als physiologisch inerte Substanz, welche sich mutmaßlich wie NaCl verhalten müsste, da es zwar die TR-Rezeptoren besetzt, hier aber wie ein kompetitiver Antagonist wirkt.
- Das Thyreomimetika-Analogon sollte ähnlich dem T3 wirken.
- Das AnaT3 sollte eine stärkere Wirkung entfalten, als das Analogon oder T3 allein.

Entgegen der ursprünglichen Erwartung und der physiologischen Reaktion beim Menschen steigt die Temperatur unter Verwendung der verschiedenen Thyreomimetika initial nicht signifikant oder stärker als bei der Kontrollgruppe mit NaCl an. Wenn es einen Unterschied gab, dann fällt dieser tendenziell zu Gunsten der Kontrollgruppe aus, d. h. die niedrigste Sterblichkeit gab es in dieser Gruppe. Des Weiteren erreichte NaCl, zusammen mit rT3 und dem Analogon die höchste Durchschnittstemperatur. Biologisch (mutmaßlich) inertes rT3 bewirkte tendenziell einen positiven Effekt. Diese Subgruppe hatte die zweitniedrigste Gesamtmortalität und die höchste Durchschnittstemperatur. Sämtliche getesteten „wahren“ Thyreomimetika konnten das Überleben nicht verbessern und auch keine Steigerung der Körperoberflächentemperatur hervorrufen.

Hinsichtlich der Differenzierung zwischen überlebenden und versterbenden Versuchstieren verlief dieser Versuch jedoch hoch signifikant. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist bei einem  $p < 0,0001$  auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  hochsignifikant.

Die retrograde Auswertung der NON-SUR zeigt trotz der unterschiedlichen Behandlung die bereits bekannte Kinetik, sodass dies retrospektiv einen positiven Schluss auf die Funktionalität des Vorhersagealgorithmus auch bei unterschiedlichsten Genotypen und Behandlungen bei Mäusen mit Sepsis zulässt.



**Abbildung 30:** Testung von Thyreomimetika.

In den Teilabbildungen a,b,c) ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass eine Oberflächentemperaturverlaufskurve abgebildet wird. Die Auswertung erfolgte mit AUGUR 2.0

Die polymikrobielle Infektion wurde mit  $1,25 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  Faeces induziert. Die Subgruppen wurden jeweils entweder mit Natriumchlorid (NaCl), Dijodthyronin (T2), Trijodthyronin (T3), reverses Trijodthyronin (rT3), ein Thyreomimetika-Analogon (Ana) sowie dieses Analogon zusammen mit Trijodthyronin (AnaT3).

Teilabbildung a) zeigt die Körperoberflächentemperaturverläufe der verschiedenen experimentellen Subgruppen. Es existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen. Tendenziell verlieren nur die Subgruppen T2 und AnaT3 deutlicher und schneller an Temperatur als die anderen vier Gruppen. Teilabbildung b) ist die Gegenüberstellung zwischen SUR und NON-SUR. Diese zeigt den bekannten, deutlich differenten Verlauf, wie bisher bereits bei den nicht antibiotisch behandelten Tieren beschrieben wurden. Dieser ist mit  $p < 0,0001$  auf dem 5%-Signifikanzniveau im Mann-Whitney-Test hochsignifikant.

Teilabbildung c) ist die retrograde und auf den Todeszeitpunkt zentrierte Darstellung der NON-SUR. Diese zeigt den charakteristischen Verlauf, der bereits zuvor beschrieben wurde, inklusive des letzten Temperaturanstieges vor dem Versterben.

#### 4.7.7 Testung der Übertragbarkeit auf andere Genotypen mittels C5a-Rezeptor-Knockout-Mäusen

In diesem Versuch wurden insgesamt 30 Versuchstiere mit zwei Genotypen des Mausstamms Balb/c (Wildtyp und C5a-Rezeptor-Knockout) in zwei Versuchsreihen und mit zwei unterschiedlichen Dosen Faeces observiert. Die Versuche wurden ohne antibiotische Behandlung der Tiere durchgeführt.

Bei 20 Tieren wurde mit  $0,8 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces, bei den anderen 10 Versuchstieren mit  $1,25 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces die polymikrobielle Infektion per PCI induziert. Beide Gruppen erhielten Volumensubstitution mittels isotonischer 0,9%-iger Natriumchloridlösung.

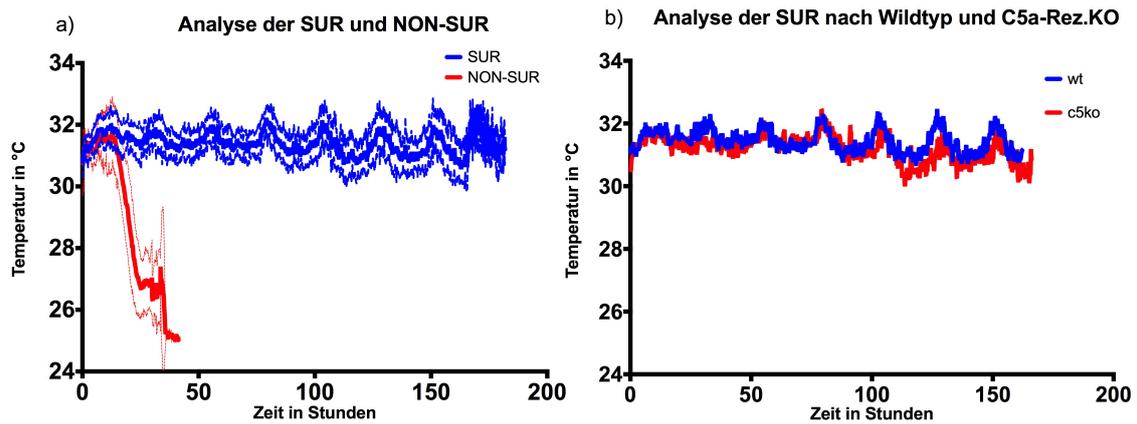
In dieser Versuchsreihe sollte die Rolle des Anaphylatoxins C5a aus der Komplementkaskade durch Ausschaltung des zugehörigen Rezeptors untersucht werden. Wesentliche Funktionen von Komplement C5a sind eine Permeabilitätserhöhung von Kapillaren und das Freisetzen von Histamin aus Mastzellen. Dies wiederum sind zentrale Elemente des septischen Schocks. Andererseits bewirkt Komplement C5a auch die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, was die Immunreaktion stützt und effizienter macht. Daher war zu vermuten gewesen, dass die Versuchstiere vom Knockout-Stamm im Vergleich zu den Wildtypen eine differente Reaktion auf die intraperitoneale Sepsis zeigen.

Die überlebenden Tiere steigen initial mit der Körperoberflächentemperatur leicht von  $31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $31,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  innerhalb der ersten 12 Stunden nach Versuchsbeginn an. Im weiteren Verlauf brechen die überlebenden Versuchstiere nie ein und zeigen bereits ab 34 Stunden post infectionem wieder einen zirkadianen Rhythmus, der sich im weiteren Verlauf immer stärker ausbildet. Somit beträgt die Temperatur in diesem thermoobservatorisch sehr stabilen Versuch  $31,4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ K}$ .

Demgegenüber halten sich die versterbenden Tiere zusammen betrachtet bis 12 Stunden p. i. zunächst stabil und verlaufen parallel zu den überlebenden Tieren. Jedoch ist hier bereits die Streuung der Messwerte deutlich größer, was ein Zeichen für die inhomogene Immunantwort ist. Im Anschluss fallen diese Tiere sehr uniform rapide ab und versterben bis Stunde 50 des Versuches.

Zwischen den Überlebenden des Wildtyps und des Knockout-Stamms gibt es mit einem  $p = 0,15$  auf dem 5%-Signifikanzniveau keinen signifikanten Unterschied, was angesichts des Mechanismus des ausgeschalteten Gens für den C5a-Rezeptor nicht den Erwartungen entsprach (Abb. 31).

Analysiert man die Daten getrennt nach der verwendeten Faecesdosis, zeigt sich dosisabhängig eine leicht differente Initialphase, bei welcher die Versuchstiere mit der höheren Dosis an Faeces auch den höheren initialen Anstieg präsentieren. Eine solche Reaktion war bislang nicht beobachtet worden, sodass hier eventuell eine Modulation des Immunsystems durch den C5a-Rezeptor-Knockout-Stamm abgebildet wird. Auf Grund der kleinen Gruppengröße kann dies jedoch lediglich als Hinweis verstanden werden, welcher auf das Outcome der Versuchstiere wenig Einfluss haben dürfte. Weiterhin zeigen beide SUR-Gruppen keinen manifesten Temperaturabfall, sondern bilden parallel zueinander einen stabilen und ausgeprägten zirkadianen Rhythmus aus. Hierbei zeigt sich auch die Relevanz der in Kapitel 3.1 beschriebenen Standardisierung des Versuchsbeginns. Über den gesamten Versuch ist bei einem  $p = 0,22$  auf dem 5%-Signifikanzniveau kein Unterschied zwischen den beiden Faeces-Dosis festzustellen (Abb. 32). Bei den versterbenden Versuchstieren zeigen sich bei insgesamt vergleichbaren Kurvenverläufen diskrete dosisabhängiger Effekte, welche bei einem  $p = 0,14$  auf dem 5%-Signifikanzniveau nicht signifikant waren. Zunächst halten beide Gruppen bis 12 Stunden p. i. die Körperoberflächentemperatur auf einem stabilen Niveau. Danach sinken sie uniform auf ca. 26 °C und präsentieren den bereits vorbeschriebenen Peak vor dem Versterben.

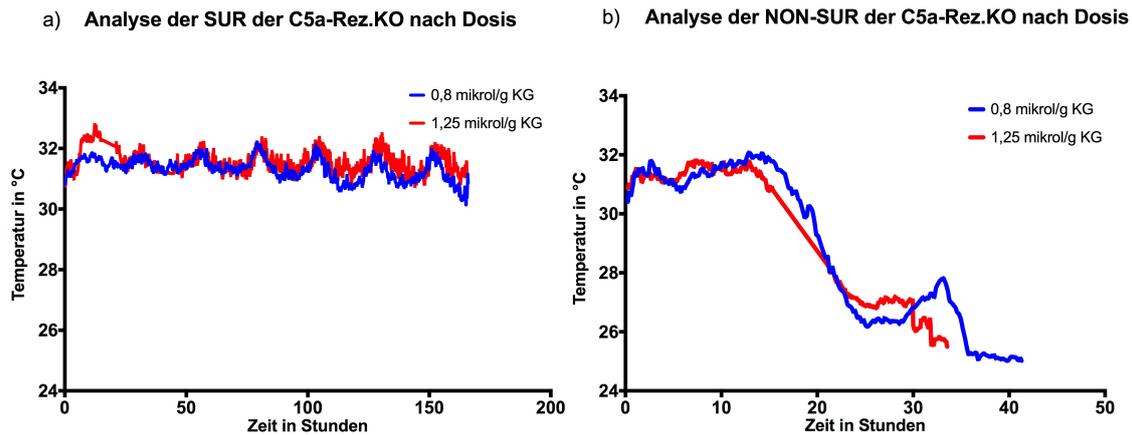


**Abbildung 31:** Darstellung der Balb/c Wildtyp und C5a-Rez.Knockout-Mäuse.

In den Teilabbildungen a und b) ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen, sodass Oberflächentemperaturverlaufskurven abgebildet werden. Die Auswertung erfolgte mittels AUGUR 2.0. In diesem Versuch wurden insgesamt 30 Versuchstiere mit zwei Genotypen des Mausstamms Balb/c (Wildtyp und C5a-Rezeptor-Knockout) in zwei Versuchsreihen und mit zwei unterschiedlichen Dosen Faeces ( $0,8 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  und  $1,25 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$ ) observiert. Die Versuche wurden ohne antibiotische Behandlung, jedoch mit Volumensubstitution durch s. c. Injektion von 0,9%-iger NaCl-Lösung der Tiere durchgeführt.

Teilabbildung a) zeigt die zusammen betrachtete Analyse der SUR und NON-SUR. Initial zeigen beide Gruppen für 12 Stunden p. i. simultane Körperoberflächentemperaturverläufe. Danach divergieren SUR und NON-SUR deutlich. Während die SUR einen stabilen zirkadianen Rhythmus mit geringer interindividueller Schwankungsbreite ( $31,4^\circ\text{C} \pm 0,3 \text{K}$ ) ausbilden, zeigen die NON-SUR einen rapiden Temperaturabfall (nach der zuvor beschriebenen Kinetik für nicht antibiotisch behandelte Versuchstiere) und versterben bis Stunde 50 des Versuches.

Teilabbildung b) analysiert die SUR nach dem vorliegenden Genotyp. Hierbei zeigt sich ein sehr homogenes Muster mit parallelem Verlauf und Wiedererlangung eines deutlichen und stabilen zirkadianen Rhythmus. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen lassen sich nicht feststellen.



**Abbildung 32:** Darstellung der Balb/c Wildtyp und C5a-Rez.Knockout-Mäuse.

Methodisches Vorgehen analog zu Abb. 31.

Teilabbildung a) unterscheidet die SUR nach eingesetzter Faecesdosis. Hierbei zeigt sich, dass die Versuchstiere mit der höheren Dosis initial einen etwas stärker ausgeprägten Temperaturzugewinn präsentieren, welcher u. U. auf den unterschiedlichen Genotyp zurückzuführen sein könnte. Bei  $n = 4$  ist dieser Unterschied aber nicht zu überschätzen. Interessant ist die hohe Homogenität beider Gruppen ( $31,33\text{ °C} \pm 0,35\text{ K}$  vs.  $31,57\text{ °C} \pm 0,38\text{ K}$ ). Im weiteren Verlauf zeigen beide Gruppen aber einen nicht signifikant unterschiedlichen Verlauf mit deutlich ausgeprägtem zirkadianen Rhythmus. Teilabbildung b) zeigt den Temperaturverlauf der NON-SUR unterteilt nach den beiden Faecesdosen. Hierbei zeigt sich, dass beide Kurven sehr simultan verlaufen, jedoch leichte dosisabhängige Effekte existieren. Nach einer initial stabilen Phase von ca. 12 Stunden fallen die Versuchstiere mit der höheren Dosis etwas zeitiger ab, der Wiederanstieg vor dem Tod fällt nicht so steil aus und die Tiere versterben mit der höheren Dosis früher. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht eruiert werden.

#### 4.7.8 Testung der Übertragbarkeit auf andere Mausstämme mittels FVB-Mäusen

In diesem Versuch wurden insgesamt 48 Versuchstiere mit zwei Genotypen des Mausstamms FVB (Wildtyp und HMOX-KO) in 5 Versuchsreihen und mit zwei unterschiedlichen Dosen Faeces ( $2,5\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG und  $2,25\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG) observiert. Die Versuche wurden mit antibiotischer Behandlung der Tiere (2 x täglich  $25\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$  KG Meropenem, gelöst in isotonischer Natriumchloridlösung) durchgeführt.

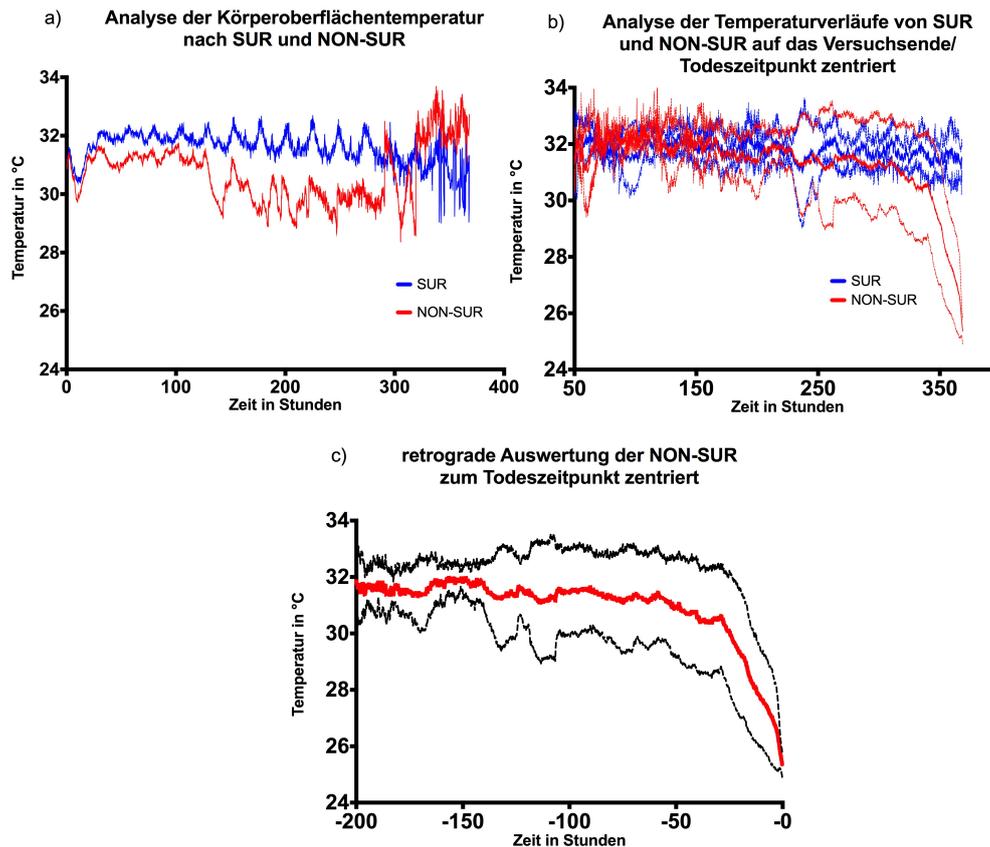
Die Hämoxygenase ist das Schlüsselenzym im Abbau von Häm zu Kohlenstoffmonoxid. Die Induktion dieses Enzyms kann die Leukozytenakkumulation im Leberparenchym reduzieren und die Organdurchblutung verbessern. Die Leukozytenakkumulation ist eine wesentliche Ursache für den septischen Leberzellschaden. Daher sollten die Hämoxygenase-

Knockout-Mäuse vermehrt septische Leberschäden ausbilden und eine höhere Mortalität aufweisen.

Sowohl die überlebenden als auch die versterbenden Versuchstiere zeigen initial einen raschen Abfall der Körperoberflächentemperatur und erholen sich im Anschluss wieder. Danach folgt bei den SUR die Ausbildung eines stabilen Plateaus und die Wiedererlangung der zirkadianen Rhythmik (Abb. 33). Bei den NON-SUR folgt der bereits bekannte ungeordnete Verlauf mit großen Schwankungsbreiten, welcher der unterschiedlichen Sterbekinetik der mit Antibiotika behandelten Tieren geschuldet ist. Werden die Tiere auf ihren jeweiligen Versuchsendpunkt (Versuchsende vs. Tod) zentriert, zeigen die SUR einen geordneten Temperaturverlauf mit engen Schwankungsbreiten und zirkadianen Rhythmus, währenddessen die interindividuelle Abweichung bei den NON-SUR bereits 100 Stunden vor dem Tod deutlich größer wird. Ab etwa 30 Stunden vor dem Tod beginnt der zweite, nun unumkehrbare Temperaturabfall mit raschem Temperaturverlust bis zum Tod. Einige Tiere zeigen auch hier einen diskreten prämortalen Temperaturanstieg, welcher aber im Mittel nicht abbildbar ist.

In der separaten Betrachtung von den FVB-Wildtypen versus den Hämoxxygenase-Knockout-Tieren fällt kein relevanter Unterschied auf (Abb. 34). Bei den NON-SUR gab es lediglich einen Ausreißer, welcher über 300 Versuchsstunden stabil blieb und dann rapide in der postakuten Phase der Sepsis verstarb.

In der Analyse der versterbenden Versuchstiere nach der eingesetzten Dosis zeigt sich, dass bereits der vermeintlich kleine Unterschied zwischen  $2,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG und  $2,25 \frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$  KG Faeces eine deutlich Veränderung der Überlebenszeit hervorruft. Während bei der höheren Dosis alle Versuchstiere nach 100 Versuchsstunden verstorben sind, dauert es bis Stunde 370, bis alle Versuchstiere mit der geringeren Dosis verstorben sind. In der auf den Todeszeitpunkt zentrierten detaillierten Analyse der Sterbephase zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Dosen, was wiederum einem Vorhersagealgorithmus erleichtert (Abb. 35).



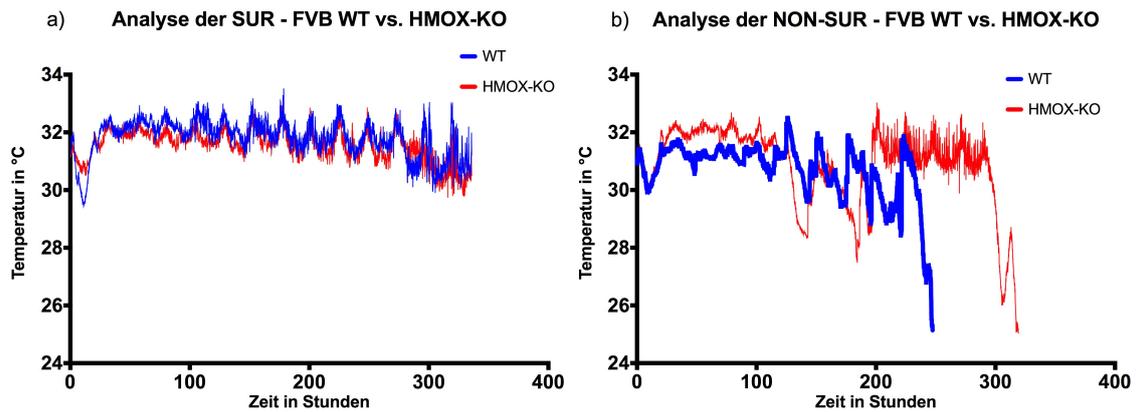
**Abbildung 33:** Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxxygenase-Knockout-Mäuse

In den Abb. 33 bis 35 ist die Temperatur in °C gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels AUGUR 2.0. In diesem Versuch wurden insgesamt 48 Versuchstiere vom Mausstamm FVB Wildtyp und HMOX-KO in 5 Versuchsreihen und mit zwei unterschiedlichen Dosen Faeces ( $2,5 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$  und  $2,25 \mu\text{g}^{-1} \text{KG}$ ) observiert. Die Versuche wurden mit antibiotischer Behandlung der Tiere ( $2 \times$  täglich  $25 \mu\text{g} \text{g}^{-1} \text{KG}$  Meropenem, gelöst in 0,9 %-iger NaCl-Lösung) durchgeführt.

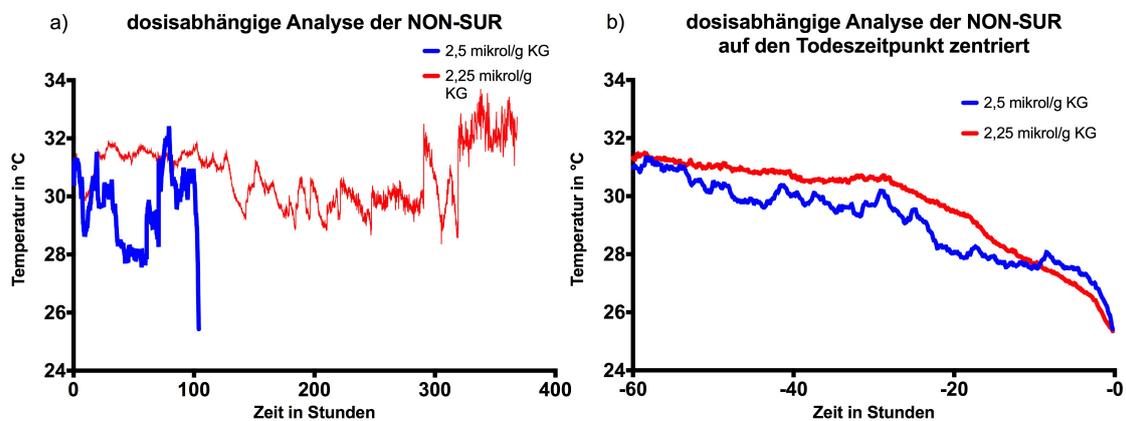
Teilabbildung a) zeigt die Auswertung der SUR und NON-SUR ohne Berücksichtigung von Genotyp oder Dosis. Beide Gruppen zeigen initial einen Temperaturabfall von im Mittel ca  $1,5 \text{K}$  und erholen sich anschließend wieder bis auf das Ausgangsniveau von  $31,5^\circ\text{C}$ . Im Anschluss bilden die SUR einen stabilen zirkadianen Rhythmus aus und halten dieses stabile Plateau bis zum Versuchsende bei etwa 400 Stunden p. i. Die NON-SUR versterben dann im weiteren Verlauf sehr heterogen. Ein einzelnes Tier hält sich sogar bis ca. Versuchsstunde 355 p. i. mit zirkadianem Rhythmus und verstirbt bei Stunde 370 p. i. sehr rasch in der postakuten Phase der Sepsis.

In Teilabbildung b) sind die Versuchstiere auf Ihren jeweiligen Endpunkt zentriert (Versuchsende bei den SUR, Tod bei den NON-SUR). Dadurch werden die sehr heterogen versterbenden NON-SUR nun auswertbar und diskriminierbar. Bereits ca. 100 Stunden prä mortal nimmt die interindividuelle Schwankungsbreite deutlich zu, bis ca. 30 Stunden vor dem Tod der terminale Temperaturabfall einsetzt, in dessen Verlauf die Versuchstiere versterben.

Teilabbildung c) zeigt den terminalen Verlauf der NON-SUR im Detail. Erneut kommt der Verlauf von antibiotisch behandelten NON-SUR ohne im Mittel nachweisbaren Wiederanstieg der Körpertemperatur vor dem Tod zur Darstellung, obwohl der terminale Temperaturanstieg in den Einzelauswertungen bei einigen Tieren nachweisbar war.



**Abbildung 34:** Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxxygenase-Knockout-Mäuse  
 Teilabbildung a und b) zeigen die Temperaturverlaufskurven nach Genotypen differenziert. Teilabbildung a) zeigt hierbei die SUR. Diese unterscheiden sich bei  $p > 0,05$  nicht signifikant.  
 Die NON-SUR, welche in Teilabbildung b) dargestellt sind, unterschieden sich ebenfalls bei  $p > 0,05$  nicht signifikant. Lediglich in der postakuten Phase der Sepsis zeigen sich Unterschiede, in dem beim HMOX-KO vermehrt Ausreißer vorkommen, welche deutlich länger als der Median überleben und dann plötzlich in der postakuten Phase der Sepsis versterben.



**Abbildung 35:** Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxxygenase-Knockout-Mäuse  
 Teilabbildungen a und b) zeigen die Temperaturverlaufskurven der NON-SUR nach Faeces-Dosis differenziert.  
 In Teilabbildung a) wird ersichtlich, dass die Versuchstiere, welche die höhere Dosis erhalten haben, wesentlich früher versterben (bis ca. Versuchsstunde 100 p. i. vs. 400 h p. i.) als die Tiere mit der geringeren Dosis (bis ca. Versuchsstunde 100 p. i. vs. 400 h p. i.).  
 Teilabbildung b) zeigt die NON-SUR mit unterschiedlich Faeces-Dosen auf den Todeszeitpunkt zentriert. Es gibt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

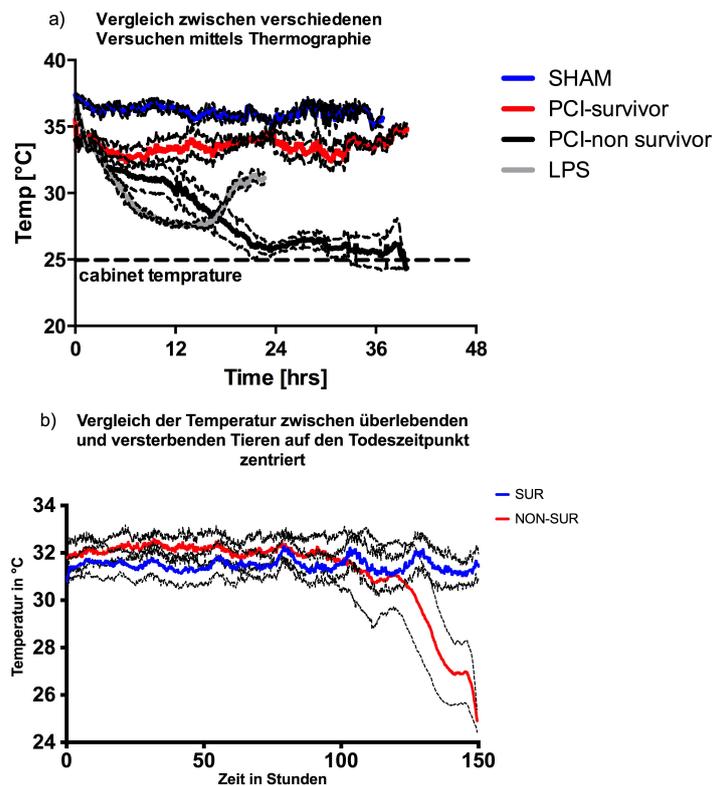
#### 4.8 Korrelation zu bisher verwendeten nicht-invasiven Bioparametern Körpergewicht und Clinical-severity-Assessment

Die Vorteile der automatisierten Infrarotthermographie liegen nicht nur im informatischen Bereich der automatischen Datenerfassung und -auswertung sowie der Möglichkeit der Benachrichtigung des Untersuchers, sondern im direkten Vergleich ist die Vorhersagekraft besser als die bisher verwendeten nicht-invasiven Bioparameter Körpergewicht (KG) und Clinical-Severity-Assessment (CSS).

In Abb. 36 ist die Vergleichbarkeit zwischen der ersten und der zweiten Version des Thermographiesystems und den beiden vorgenannten Parametern aufgezeigt. Die Temperaturkurven zeigen je nach Protokoll des Versuches einen charakteristischen Verlauf, welcher bei jeweils identischem Versuchsablauf (PCI, keine antibiotische Therapie) innerhalb enger Konfidenzintervalle verläuft. Die Vergleichsgruppe hält sich während des gesamten Versuches sehr stabil, die Überlebenden fallen initial ab und halten sich dann im weiteren Verlauf stabil, währenddessen die nicht überlebenden Tiere stark abfallen, in Folge versterben und die Käfigtemperatur annehmen. Analog zu den vorher beschriebenen Versuchsergebnissen ist auch das Versuchsprotokoll mit Lipopolysaccharid deutlich divergent zu den PCI-Versuchen, indem die Temperatur sehr uniform initial abfällt und dann ebenso uniform wieder ansteigt. Auch bei den antibiotisch behandelten Tieren mit der längeren Versuchslaufzeit zeigt sich am Versuchsende eine deutliche Divergenz.

Beim CSS ist die Gruppe der NON-SUR über die gesamte Versuchslaufzeit höher bewertet worden als die Überlebenden. Dieses Ergebnis wird jedoch durch den Umstand verzerrt, dass die NON-SUR über einen langen Zeitverlauf versterben und die moribunden Tiere, welche subjektiv stark beeinträchtigt sind, somit den Durchschnitt dieser Tiere nach oben verschiebt. Im Einzelfall ist in dem Zeitintervall zwischen der Erholung nach der initialen Verschlechterung und dem Versterben ebenso wie mit der Thermographie eine Prognosestratifizierung über einen längeren Zeitraum nicht möglich. Es zeigt sich jedoch, dass die Körperoberflächenthermographie und der CSS statistisch signifikant bei einem  $p < 0,001$  und einem Pearson Korrelationskoeffizient von  $r = -0,54$  zusammenhängen. Dies bedeutet, dass ein Zusammenhang erkennbar, aber nicht sehr stark ist. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als das mit beiden Methoden der Tod einen bestimmten Zeitraum im Voraus erkannt werden kann. Deutlicher ist der Zusammenhang jedoch nicht, da beide Methoden grundverschieden sind, was die Messwertaufnahme angeht. Auf der einen Seite der subjektive Parameter CSS, auf der anderen der Surrogatparameter Körperoberflächentemperatur, welcher jedoch als automatisch zu erfassender biologisch-physikalischer Messwert einen anderen Stellenwert hat, was die Reproduzierbarkeit angeht.

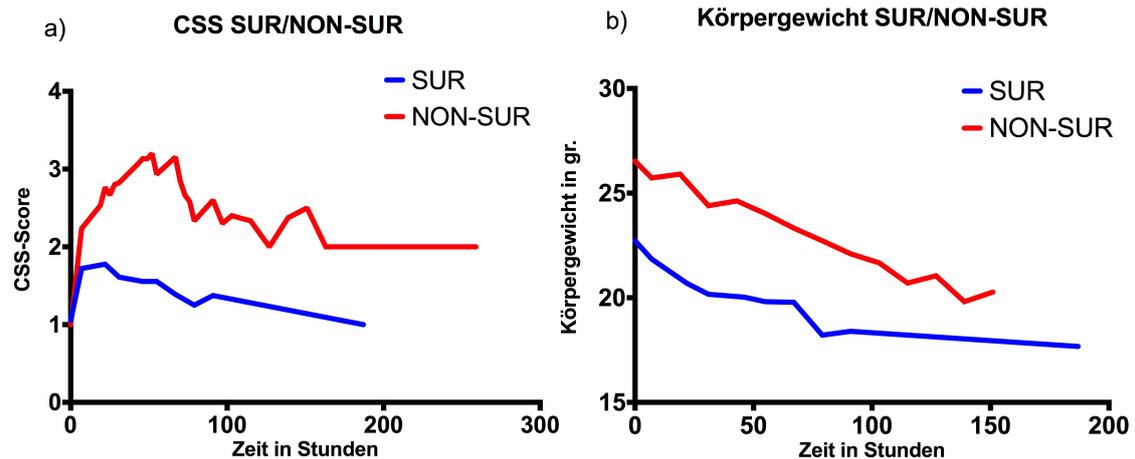
Das Körpergewicht, welches ebenfalls bei vielen Versuchen routinemäßig mit erfasst wird, hat hingegen mit einem  $p > 0,05$  keine statistisch signifikante Korrelation mit der Temperatur oder dem CSS. Sowohl die überlebenden als auch die versterbenden Versuchstiere verlieren über die gesamte Versuchslaufzeit an Gewicht (Abb. 37). Somit scheidet dieser Parameter nach den durchgeführten Untersuchungen als Prognoseparameter aus. Auffällig jedoch ist, dass die NON-SUR ein deutlich höheres Gewicht hatten als die SUR. Dies ist ein Umstand, der bei weiteren Untersuchungen überprüft werden wird, um die gewichtsadaptierte Injektion der Faecessuspension zu evaluieren.



**Abbildung 36:** Darstellung der Konsistenz der Körperoberflächenthermographie in den verschiedenen vorher beschriebenen Versuchsreihen in der Diskrimination von SUR und NON-SUR.

In den Teilabbildungen a und b) sind Temperaturverlaufskurven im Mittelwert von den vorher beschriebenen Versuchsreihen dargestellt.

Teilabbildung a) sind vergleichend die mit AUGUR 1.0 aufgenommenen Daten zwischen verschiedenen Versuchsgruppen aufgezeigt: SHAM-Tiere, SUR, NON-SUR und LPS-behandelte Tiere. Es gibt deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen, insbesondere zwischen den versterbenden und den überlebenden Versuchstieren. In Teilabbildung b) ist derselbe deutliche Unterschied zwischen SUR und NON-SUR auch mit AUGUR 2.0 und Versuchstieren mit antibiotischer Behandlung dargestellt, insofern die Versuchslaufzeiten auf den Endpunkt zentriert werden, da der Todeszeitpunkt bei diesen Versuchen so heterogen ist.



**Abbildung 37:** Darstellung des Verlaufs des Clinical Severity Score und des Körpergewichts der Versuchstiere.

In den Teilabbildungen a und b) sind die Mittelwertverlaufskurven für die beiden untersuchten ebenfalls nicht-invasiven Parameter CSS-Score und Körpergewicht dargestellt. Teilabbildung a) zeigt den zeitlichen Verlauf des CSS-Scores. Auch hier demarkiert sich ein deutlicher Unterschied zwischen SUR und NON-SUR, was jedoch auf Grund des heterogenen Versterbens und des damit einhergehenden höheren Scores der versterbenden Tiere verfälscht wird. Dies wird auch durch den deutlich gezackten Kurvenverlauf der NON-SUR bestätigt, welcher nach dem Versterben der Versuchstiere wieder abfällt, um bei bevorstehendem Tod weiterer Tiere erneut zu steigen.

In Teilabbildung b) ist der Verlauf des Körpergewichtes dargestellt. Bis auf den unterschiedlichen Startpunkt, welcher Gegenstand einer systematischen Überprüfung des PCI-Modells war, zeigt sich lediglich, dass in beiden Gruppen das Körpergewicht über die gesamte Versuchslaufzeit hindurch fällt. Somit ist dieser Parameter allein auf Grund dieser Betrachtung zur Prognosestratifizierung ungeeignet.

Zur weiteren Differenzierung der prognostischen Validität und der Definierung von Schwellenwerten für die drei nicht-invasiven Methoden wurden ROC-Kurven für die letzten 36 Stunden der Versuche angefertigt. Für den Zeitpunkt 12 Stunden vor Versuchsende bzw. Tod sind die Ergebnisse in Abb. 38 dargestellt, für den Verlauf der Vorhersagegenauigkeit in Abb. 39.

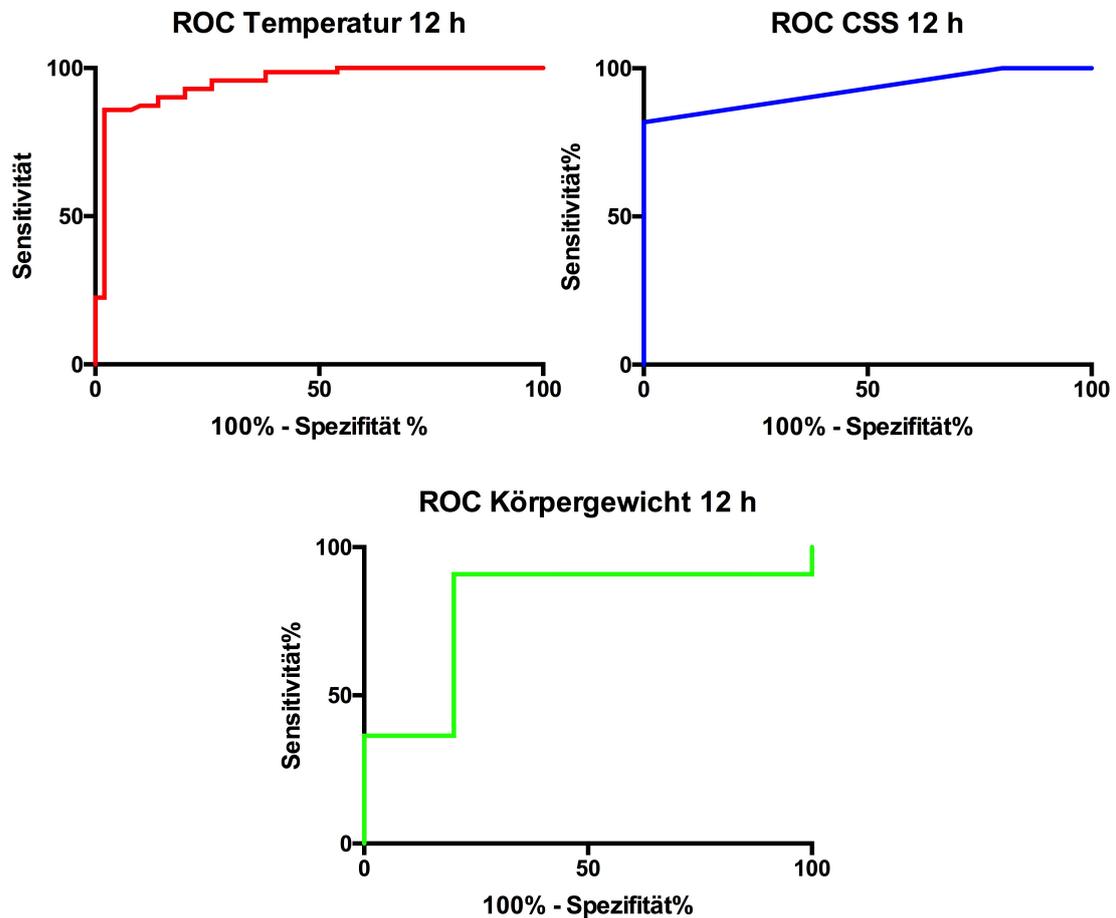
Bei der singulären Betrachtung der Schwellenwerte 12 Stunden vor dem Tod liegt bei der Infrarotthermographie die AUC bei 0,95 (0,91-0,99) bei einem  $p < 0,0001$ . Dies ist für ein Testverfahren ein sehr belastbares Ergebnis. Es ergab zudem, dass ein Cut-Off-Wert von  $28,7^{\circ}\text{C}$  die höchste Likelihood-Ratio erzielte.

Beim CSS liegt die AUC bei 0,92 (0,80 - 1,00) bei einem  $p=0,008$ . Das größere Konfidenzintervall ergibt sich aus dem bei der manuellen Erfassung des subjektiven Befindens der Versuchstiere resultierenden geringeren Stichprobenumfangs. Der Cut-Off liegt bei einem Wert von 2,5. Dies bedeutet, dass bei jedem leicht bis mittelstark beeinträchtigtem Tier das Versterben anzunehmen ist. Das Körpergewicht der Versuchstiere verpasst wie schon in der Auftragung über die Zeit zu erwarten das Signifikanzniveau mit einem  $p = 0,06$  und es wird bestätigt, dass sich dieser Parameter nicht zur Stratifizierung des Outcomes eignet.

Wird die Entwicklung der AUC über die letzten 50 Versuchsstunden inklusive der dazugehörigen Konfidenzintervalle dargestellt, erhält man ein Verlaufsdiagramm für die diagnostische Güte des jeweiligen Parameters (Abb. 39).

Bei der Infrarotthermographie pendelt dieser Wert zunächst um 0,75, um 25 Stunden präfinal auf einen Wert um 0,5 zu sinken. Anschließend steigt die AUC kontinuierlich bis zum Versuchsende an. Auffällig ist das über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr enge Konfidenzintervall, sodass bis auf ein kleines Zeitintervall 25 Stunden vor Versuchsende dauerhaft eine signifikante Vorhersage möglich wäre. Es ist allerdings ersichtlich, dass eine wirklich belastbare Aussage erst 22 Stunden vor dem Ereignis möglich ist und die Vorhersagegüte mit der Nähe zum Versuchsende bzw. Tod des Versuchstieres steigt. Ab ca. 12 Stunden vor dem Tod liegt diese wie bereits in Abb. 38 ersichtlich bei einer AUC = 0,95.

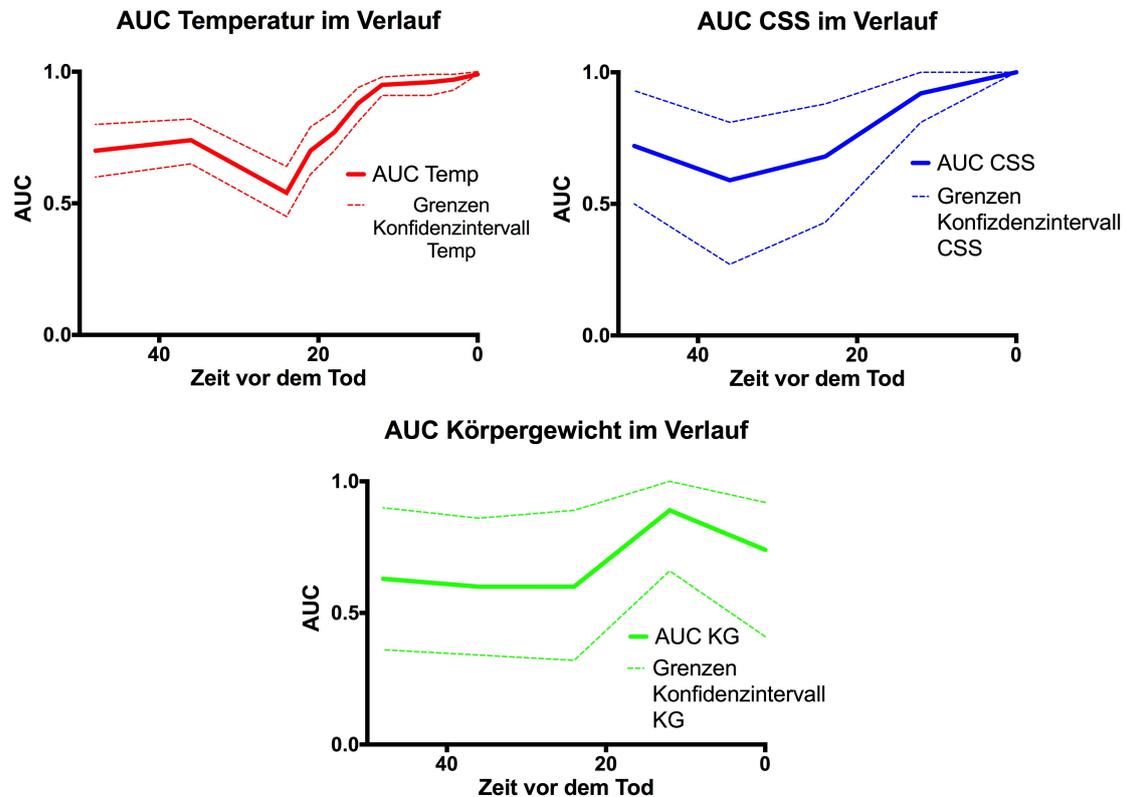
Bei dem CSS sieht die Verlaufskurve ähnlich dem der Körperoberflächentemperatur aus, d. h. bis ca. 23 Stunden vor dem Tod bzw. Versuchsende schwanken die Werte bei einer AUC um 0,7 und danach erfolgt ein steiler Anstieg. Im Gegensatz zur Körperoberflächentemperatur ist diese Vorhersage jedoch nicht statistisch signifikant, da bis ca. 20 Stunden vor dem terminalen Ereignis das Konfidenzintervall den Indifferenzwert 0,5 mit einschließt. Danach wird das Konfidenzintervall deutlich enger, jedoch darf hierbei nicht außer Acht



**Abbildung 38:** Darstellung der ROC-Kurven sowie der Analysen der drei überprüften Parameter 12 Stunden vor dem Tod bzw. Versuchsende.

Die Körperoberflächentemperatur hat mit einer AUC von 0,95 (CI: 0,91-0,99,  $p = < 0,0001$ ) die stärkste Vorhersagekraft. Danach folgt der CSS-Score mit einer AUC von 0,93 (CI: 0,8 - 1;  $p = 0,0078$ ), wobei hierbei bereits das größere Konfidenzintervall auffällt, welches der geringen Streubreite mit dem nur 5-stufigen Likert-skaliertem CSS-Score bedingt ist.

Das Körpergewicht verpasst mit einem statistisch nicht signifikanten Ergebnis den Status als Parameter zur Prognosestratifizierung.



**Abbildung 39:** Darstellung der Validität der Vorhersagewerte der einzelnen Stratifizierungsmethoden.

In dieser Abbildung ist der Verlauf der AUC sowie deren Konfidenzintervalle von ROC-Analysen bis zu 50 Stunden vor dem Tod bzw. Versuchsende aufgetragen.

Die Infrarotthermographie stagniert bis 25 Stunden präfinal bei 0,75, um dann auf einen Wert um 0,5 zu sinken. Ab 21 Stunden präfinal steigt die AUC bis zum Versuchsende steil an. Über den gesamten Zeitraum zeigt sich ein sehr enges Konfidenzintervall, welches bis auf einen kleinen Zeitraum um 24 Stunden präfinal dauerhaft über 0,5 liegt. Eine belastbare Aussage wird in den 21 Stunden vor dem Ereignis möglich und die Vorhersagegüte steigt mit der Nähe zum Versuchsende bzw. Tod des Versuchstieres. Ab ca. 12 Stunden vor dem Tod liegt diese wie bereits in Abb. 28 ersichtlich bei einer AUC = 0,95. Bei dem CSS liegt bis 24 Stunden vor dem Tod bzw. Versuchsende die AUC bei 0,7 und danach folgt ein steiler Anstieg. Im Gegensatz zur Körperoberflächentemperatur ist diese Vorhersage jedoch nicht statistisch signifikant, da bis ca. 20 Stunden vor dem terminalen Ereignis das Konfidenzintervall den Indifferenzwert 0,5 mit einschließt. In den letzten 12 Stunden präfinal wird das Konfidenzintervall deutlich schmaler, erreicht jedoch nicht die Güte wie bei der Infrarotthermographie. Beim Körpergewicht schließt das Konfidenzintervall dauerhaft den Indifferenzwert ein, erlangt also keine statistische Signifikanz.

gelassen werden, dass bei der Auswertung, die dieser Analyse zu Grunde lag, der Ausgang des Experimentes für das jeweilige Tier bekannt war. Somit differieren diese beiden Subgruppen natürlicherweise auch deutlich stärker, als das dies im prospektiven Experiment zu verifizieren war. Denn die versterbenden Versuchstiere hatten am Versuchende eine Temperatur unter 38,7 °C bzw. über 2,5 CSS-Punkte, wogegen gesunde Tiere eine Temperatur über 38 °C bzw. 1 CSS-Punkt haben. Im Verlauf eines Versuchs ist es wie in Abb. 40 gezeigt, deutlich herausfordernder, bei einmaligem Erreichen des Cut-Offs einen bevorstehenden Tod vorherzusagen. Noch diffiziler ist es, den Todeszeitpunkt vorherzubestimmen bzw. eine Entscheidung für oder gegen eine vorzeitige Versuchsintervention/Abtötung und Organentnahme zu treffen.

Das Körpergewicht erreicht wie in den vorangegangenen Analysen bereits abgezeichnet nie ein statistisch signifikantes Ergebnis und scheidet als Parameter für die Prognosestratifizierung aus.

#### **4.9 Vorhersagevalidität**

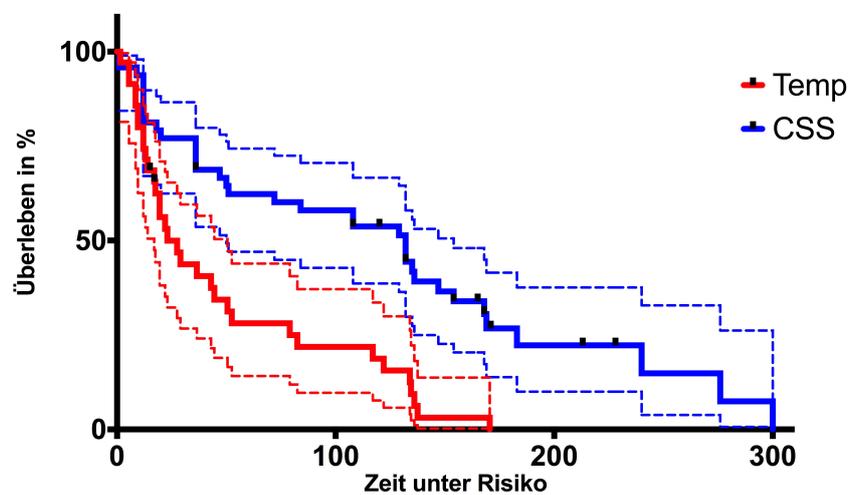
Die Definition der Cut-Off-Temperatur weicht auf Grund der unterschiedlich langen Versuchslaufzeit und der dadurch bedingten schwierigen parallelen Interpretierbarkeit der Daten von der Generierung von Cut-Offs für Laborparameter ab. Dies ist bedingt dadurch, dass versterbende Tiere aus einem Versuch herausfallen und somit zum eigentlichen Endpunkt nicht mehr zur Verfügung stehen können. Des Weiteren schwanken Versuchstiere wie bereits vorab beschrieben mit der Körpertemperatur, insbesondere wenn bei ihnen die Sepsis induziert wurde und ggf. die Verwendung hoher Faeces-Dosen unter Therapie mit Antibiotika erfolgt. Somit war die retrospektive Betrachtung und Generierung von ROC-Analysen nur ein erster Schritt zur Überprüfung der Körperoberflächentemperatur. Bei beiden in Frage kommenden Parametern war es zudem denkbar, dass ein Versuchstier den vorher definierten Cut-Off erreicht, aber dann entweder den Versuch überlebt oder erst nach einer langen Latenzphase verstirbt, was wiederum die Vorhersagegenauigkeit beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde eine Kaplan-Meier-Analyse (Abb. 40) zur Überprüfung der Zeit unter Risiko erstellt, welche mit den daraus abzulesenden Parametern ein Hinweis auf die Vorhersagepräzision erlaubt. Auf Grund von der aus der ROC-Analyse retrospektiv gewonnenen Daten sowie der praktischen Erfahrung ergab sich ein Cut-Off-Wert von 38,7 °C. Dieser zeigt bei 33 Versuchstieren aus der schwierig zu prädiktierenden Versuchsgruppe mit hoher Dosis Faeces und Verwendung von Antibiotika eine Sensitivität von 99 %. Die Spezifität fällt mit 75 % etwas schlechter aus, dies liegt jedoch daran, dass vereinzelt Versuchstiere initial unter den Cut-Off-Wert fallen, sich erholen und den Versuch überleben.

Der negativ prädiktive Wert liegt bei 99 %, der positiv prädiktive Wert bei 94,3 %. Bei der Auswertung der angefertigten Kaplan-Meier-Kurve ergibt sich ein medianes Überleben von 23 Stunden nach Erreichen des Cut-Offs und lediglich zwei Versuchstiere, welche nach Erreichen des Cut-Offs nicht verstorben sind. Die Kaplan-Meier-Kurve ist mit annähernd negativ exponentiell zu beschreiben.

Auf Grund der wenigen Zwischenstufen beim 5-stufigen CSS-Score ergab sich auf Grund der retrospektiven Datenanalyse und der Erfahrung der Untersucher ein Cut-Off-Wert von 2,5 CSS-Punkten. Ein Tier musste wenigstens einmal einen Wert von 3 Erreichen, um als NON-SUR klassifiziert zu werden. Bei der Analyse von 48 Versuchstieren sowohl von Tieren mit als auch Tieren ohne Antibiose ergab sich eine Sensitivität von 85 %. Die Spezifität lag bei 45 %, der positiv prädiktive Wert bei 75 % sowie der negativ prädiktive Wert bei 63 %. Die Analyse der Kaplan-Meier-Kurve ergab ein medianes Überleben von 132 Stunden sowie 12 Versuchstiere, welche als NON-SUR klassifiziert wurden, den Versuch aber überlebten (dies spiegelt sich auch in den schlechteren Vorhersagewerten in der Vierfeldertafel wider). Die Verlaufsfunktion der Kaplan-Meier-Kurve ist auch als annähernd stetig zu beschreiben.

Im direkten Vergleich der für die Vorhersagepräzision herangezogenen Kaplan-Meier-Analyse ist die bereits im Vorfeld genannte unterschiedliche Kurvenverlaufsform sowie das deutlich unterschiedliche mediane Überleben auffällig. Das kürzere mediane Überleben ist in diesem Zusammenhang als höhere Präzision der Prognose zu werten. Der Unterschied zwischen beiden Verlaufskurven ist mit  $p < 0,0001$  gemäß dem Log-Rank-Test statistisch signifikant. Die Hazard-Ratio bestätigt, dass das Risiko des Versterbens beim Erreichen des Cut-Off-Wertes der Körperoberflächentemperatur das 2,5-fache des Risikos bei Erreichen des CSS-Schwellenwertes ist. Hierbei wurden auf Grund der Bedingungen für die Analyse jedoch bereits die falsch prognostizierten Ereignisse im Sinne von zensierten Daten herausgerechnet (Abb. 40).

Kaplan-Meier-Kurven von Körperoberflächentemperatur und CSS-Score



**Abbildung 40:** Kaplan-Meier-Analyse für den Zeitraum nach Erreichen des Cut-Off-Wertes. Die beiden Kurven unterscheiden sich statistisch signifikant (Log-rank:  $p < 0,0001$ ). Die Infrarotthermographie erreicht mit einem medianen Überleben von 23 Stunden bei nur 2 zensierten Datensätzen eine deutlich höhere Präzision der Prädiktion als der CSS-Score mit einem medianen Überleben von 132 Stunden bei insgesamt 12 zensierten Datensätzen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Prädiktion anhand etablierter Stratifizierungsmethoden

Die bisher verwendeten Stratifizierungsmethoden haben grundsätzlich zwei verschiedene methodische Ansätze, was ihren jeweiligen Endpunkt anbelangt. Die eine Gruppe, welche aus ethischer und tierschutzrechtlicher Sicht agiert, möchte möglichst frühzeitig das definitive Versterben des Versuchstieres voraussagen, um das Leiden möglichst zu reduzieren und bei unausweichlichem Tod Blut- und Organproben zu entnehmen.

Die andere Gruppe möchte mit einer eher klinischen Betrachtungsweise herangehen, indem es um die Definition von Interventionszeitpunkten geht, zu welchem eine entsprechende Therapie bei einer bestimmten Subgruppe einsetzen muss, um den Therapieverlauf günstig zu beeinflussen. Dies wiederum gibt unter Umständen wertvolle Erkenntnisse für die Effizienz neuer pharmakologischer Therapien oder supportiver Maßnahmen.

Eine effiziente Stratifizierungsmethode kann dabei helfen, Subgruppen, welche von einer neuen Behandlung profitieren könnten, bereits in der vorklinischen Forschung zu identifizieren. Des Weiteren kann eine effiziente Stratifizierung auch zur Resolution der Krankheitsentität Sepsis bzw. septischer Schock und septisches Multiorganversagen mit den bereits im Tierversuch variablen Verläufen beitragen.

Eine sehr schnelle und einfache Methode zur Risikostratifizierung ist die subjektive Auswertung vom Habitus und der Lokomotion der Versuchstiere (siehe Tab. 2) (Gonnert et al. 2011). Diese ist ohne Einfluss auf den Versuchsverlauf, da die Einschätzung bei der regulären und tierschutzrechtlich vorgeschriebenen direkten Inaugenscheinnahme möglich ist. Jedoch ist die hier erfolgte graduelle Einschätzung nur sehr schwer zu objektivieren.

Diese graduelle Einschätzung anhand eines in der betreuenden Einrichtung etablierten und publizierten Scoringsystems basiert auf ordinal-skalierten Items, welche u. U. zwischen zwei differenten Untersuchern variieren kann, sodass ein nicht zu unterschätzender Interrater-Bias entsteht. Die Grenzen zwischen den einzelnen Items sind häufig aufgrund der angestrebten Einfachheit des Systems nicht hinreichend abgrenzend zu definieren oder das observierte Versuchstier erfüllt Eigenschaften von zwei unterschiedlichen Items. So kann bei gleichem klinischen Erscheinungsbild ein nicht zu erklärender Unterschied zwischen zwei Untersuchern auftreten. Häufig wird dieser Parameter dennoch als humaner Endpunkt bei Erreichen eines bestimmten klinischen Erscheinungsbildes gewählt (Hankenson et al. 2013, Gonnert et al. 2011).

Clinical Severity Score				
Grad	Qualität	Kriterien		
		Spontanaktivität	Reaktion auf exogene Stimuli	Haltung
1	keine Belastung	schnelle, arttypische Bewegungen	neugierig, schnelle Reaktion auf haptische Reize, Reaktion auf visuelle Reize	normal
2	geringe Belastung	geringe Aktivität, vereinzelte Aktivitätspausen, Ataxie, Zittern	reduzierte Aufmerksamkeit, jedoch adäquate Reaktion auf haptische Reize, geringe Reaktion auf visuelle Reize	leicht gekrümmt, Piloerektion, schlaffer Schwanz
3	mittlere Belastung	stark verlangsamte und abnormale Bewegungen, häufige Aktivitätspausen, schläfrig	stark verlangsamte Reaktion auf haptische Reize, keine Reaktion auf visuelle Reize	gekrümmt, Piloerektion, schlaffer Schwanz
4	schwere Belastung	lethargisch, keine Aktivität	keine Reaktion auf Umweltreize	starker Buckel, Piloerektion, schlaffer Schwanz

**Tabelle 2:** Die Tabelle zeigt die Beurteilungsskala des CSS-Scores, modifiziert nach (Gonert et al. 2011)

Eine objektivere aber auch invasive Stratifizierung ist mittels molekularbiologischer Parameter möglich. Hierbei sind insbesondere die Kinetik und Dynamik pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere Interleukin-6 (IL-6) und Procalcitonin (PCT) untersucht worden. Das Problem dieser Parameter, welche nur über eine Blutentnahme bestimmt werden können, stellt jedoch die Invasivität, der dynamische Krankheitsverlauf und der Aufwand für die nachfolgende und zeitnahe Bestimmung dar. Zum einen besteht das Problem in der Definition der a priori festgelegten Zeitpunkte für die Blutentnahmen. Denn die Krankheitsentität Sepsis wie auch die das septische Multiorganversagen bzw. der septische Schock sind hochvariable Krankheitsbilder, welche gemäß den in dieser Arbeit vorgelegten Daten so immense Differenzen zwischen individuellen Verläufen zeigen, dass geplante und fest definierte Abnahmezeitpunkte pathophysiologisch großen Schwankungen unterliegen müssen und daher wenig sinnvoll erscheinen.

Des Weiteren ist die Blutentnahme bei Versuchstieren im septischen Schock auf Grund der Kreislaufzentralisation und der geringen vorhandenen peripheren Blutmenge schwierig, fehleranfällig und belastend. Außerdem ist eine dadurch resultierende Beeinflussung des Experimentes nicht mit Sicherheit auszuschließen. Zum anderen ist der damit verbundene Aufwand erheblich. Die Blutentnahmen sind für das Versuchstier belastend und die Bindung von Laborkapazitäten ist auf Grund der erforderlichen molekularbiologischen Bestimmungsmethoden nicht zu unterschätzen. Ein Nebenaspekt dieser Methode ist, dass vor der Bestimmung Cut-Offs validiert werden müssen, welche je nach verwendetem Verfahren unterschiedlich sind und bei Wechsel oder Einführung in das Labor neu evaluiert werden müssen.

Insbesondere IL-6 erlaubt die Vorhersage der Sterblichkeit u. a. im CLP-Modell der Sepsis (Osuchowski et al. 2006, Osuchowski et al. 2007, Osuchowski et al. 2009). Andere validierte Parameter sind PCT, Interleukin-5 (IL-5), Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra), Interleukin-10 (IL-10), Blutharnstoffkonzentration (BUN), Alanin-Amino-Transferase (ALAT), Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) sowie Zellzählungen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten usw.).

Letztere werden in der tierexperimentellen Forschung zwar häufig retrospektiv untersucht und deskriptiv publiziert, jedoch ist keine Publikation bekannt, in der diese Parameter prospektiv zu Prognose-assoziierten Interventionen eingesetzt wurden. Häufig wird zur Diagnostik dieser Parameter ein Blutbild angefertigt, welches die Konzentration an Erythrozyten (sowie deren Indizes MCH, MCV, MCHC), den Hämatokrit, Leukozyten (sowie deren Subformen) und Thrombozyten darstellt. In der Literatur werden diese Parameter jedoch selten systematisch erfasst, was insofern interessant ist, als das dies klinisch sehr oft verwendete Marker sind, welche auf Grund ihrer schnellen Verfügbarkeit und validierten Ergebnisse rasch zu Verfügung stehen. Im Rahmen der tierexperimentellen Forschung mit Mäusen wird hierbei ein Anstieg der Leukozyten und Thrombozyten, sowie ein Abfall der Erythrozyten und des Hämatokrits beschrieben (Craciun et al. 2010, Craciun et al. 2014, Drechsler et al. 2011).

Die nächste Gruppe stellen die Organfunktions- bzw. Organdysfunktionsparameter dar. Hierzu zählen die Glukosekonzentration, ALAT, ASAT, Laktatdehydrogenase (LDH), BUN,  $\alpha$ -Amylase oder Kreatinin (Crea). Diese werden ebenfalls klinisch häufig als Verlaufsparemeter und Indikatoren für Organdefekte genutzt. In der translationalen Forschung gibt es jedoch wenige Ansätze, diese für eine Stratifizierung zu verwenden (Drechsler et al. 2011, Craciun et al. 2014, Gao et al. 2012), wobei diese Parameter auch im Mausmodell Indikatoren für einen spezifischen Organschaden sind.

PCT ist ein relativ später Marker für eine akute bakterielle Infektion, jedoch ein zuverlässiger Marker für sepsisassoziierte Sterblichkeit. Im klinischen Alltag wird dieser molekularbiologisch bestimmte Indikator als Surrogat für die systemische Immunantwort genommen, da er bei lokalen Entzündungsreaktionen im Gegensatz zum C-reaktiven Protein nicht ansteigt. Im Mausmodell der Sepsis sagt eine Messung nach ca. 84 Stunden post infectionem die 10-Tages-Mortalität mit einer Area under Curve (AUC) von 0,88 vorher (Biju et al. 2012, Redl et al. 2000, Nylen et al. 1998).

Der in der translationalen Sepsisforschung meist untersuchte Prädiktor für die Stratifizierung des Versuchsausganges ist das Zytokin IL-6. Insbesondere die Arbeitsgruppe von M. F. Osuchowski in Wien hat sich um die Risikostratifizierung mittels IL-6 verdient gemacht. Bei der molekularbiologischen Bestimmung des IL-6 behilft man sich zum Teil auch mit Dual-Cut-Offs, welche einen indifferenten Bereich in der Mitte haben, in welchem man den Ausgang des Tieres kaum präzise prognostizieren kann. Dies erfolgt, um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Da IL-6 ein sehr früher Marker der Sepsis ist, kann man bereits zum Zeitpunkt 6 Stunden p.i. mit einer AUC von 0,83 potenzielle Überlebende von potenziell versterbenden Versuchstieren diskriminieren (Iskander et al. 2013a, Osuchowski et al. 2006, Raeven et al. 2012, Raeven et al. 2013, Drechsler et al. 2011, Drechsler et al. 2012, Osuchowski et al. 2009, Osuchowski et al. 2012, Craciun et al. 2014, Craciun et al. 2010, Moitra et al. 2012, Remick et al. 2002, Gao et al. 2012, Vyas et al. 2005, Turnbull et al. 2004, Panayiotou et al. 2010, Wang et al. 2006, Redl et al. 2000).

Für die Bestimmung dieser Parameter bedarf es jedoch eines zusätzlich und häufig mehrfach durchgeführten invasiven Eingriffs – die Blutentnahme. Des Weiteren müssen die gewonnenen Blutproben mittels Serumpräparation und auf immunologischen Arbeitstechniken basierenden Analysen aufwendig weiterverarbeitet werden. Auch wenn die Entnahmetechnik durch den geübten Anwender perfektioniert wurde und die Labormethoden so effizient wie möglich gehalten werden (Weixelbaumer et al. 2010, Osuchowski et al. 2005), verbleibt ein nicht zu unterschätzendes Trauma für die Versuchstiere mit einer nicht abschätzbaren Beeinflussung des Versuchsausganges. Ein Vergleich der entnommenen Blutmenge zeigt die potenzielle Bedeutsamkeit des Einflusses: Wenn bei einer *Mus musculus* von ca. 25 g Körpergewicht täglich 20 µl Blut entnommen werden, entspricht dies bei einem Menschen von ca. 70 kg einem täglichen Blutverlust von ca. 50 ml. Dies ist jedoch eine sehr konservative Schätzung, da die entnommene Menge Blut das Mindestmaß für die Analyse darstellt und der tatsächliche Blutverlust, insbesondere bei Versuchstieren im septischen Schock in Abhängigkeit von der Entnahmetechnik mitunter deutlich höher sein dürfte.

Hier stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Zum einen die schonendere Methode der Blutentnahme aus einer Schwanzvene wird bei zentralisiertem Kreislauf sehr schwierig bis technisch unmöglich sein. Die andere häufig angewandte Blutentnahme aus einem retroorbitalen Plexus funktioniert auch bei septischen Tieren gut, hat jedoch eine höhere Nebenwirkungsrate, die insbesondere die Belastung der Tiere vermehrt und zusätzlich ein größeres Risiko für (mitunter unentdeckte) Nachblutungen darstellt. Die repetitive Blutentnahme aus einer Vena facialis (wie bei Osuchowski und Weichselheimer beschrieben) dürfte zwischen den beiden beschriebenen Methoden liegen, aber auch hier ist die Komplikationsrate nicht zu unterschätzen und der zusätzliche Stress und die Belastung für die Versuchstiere ist hoch.

Eine weitere Möglichkeit zur Stratifizierung des Outcomes bei Tierversuchen zur Untersuchung polymikrobieller Infektionen ist die Echokardiographie. Diese ermöglicht als primär nichtinvasive Untersuchungsmethode die unmittelbare Beurteilung der Morphologie der Pumpfunktion des Herzens (Lang et al. 2006). Des Weiteren stellt sie ein geeignetes Verfahren zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung der Sepsis-assoziierten myokardialen Dysfunktion dar (Beraud et al. 2014). Mit der Echokardiographie konnte gezeigt werden, dass sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine verminderte Myokardfunktion manifestiert, deren Ausmaß mit dem Outcome der Versuchstiere assoziiert ist (Rudiger et al. 2013).

Hierbei ist jedoch als Einschränkung anzumerken, dass diese Korrelation hauptsächlich in alten Versuchstieren (ab einem Alter von ca. 8 Monaten) zu beobachten ist, währenddessen bei jungen Versuchstieren (Alter ca. 2 - 5 Monate) lediglich diskrete Veränderungen zu beobachten sind. Nichtsdestotrotz werden für die meisten Studien junge Versuchstiere verwendet, um einen möglichen Bias hinsichtlich des Progresses von Vorerkrankungen auszuschließen (Khan et al. 2013). Letztlich ist aber diese Vorgehensweise aber nicht analog zu dem klinischen Erscheinungsbild, wo Sepsis eher eine Erkrankung des älteren und häufig multimorbiden Patienten ist.

Als Marker für die ventrikuläre Funktion werden morphologisch die Wanddicke sowie die Durchmesser der Ventrikel bestimmt, welche wiederum mit den Füllungsvolumina und der Kinetik der Wandbereiche korrelieren. Des Weiteren wird mittels der gemessenen Wandbewegungen sowie der Ventrikelvolumina und der daraus errechneten Ejektionsfraktion die systolische Pumpfunktion des Herzens beurteilt. Als weitere Indikatoren für die systolische Funktion werden der Blutfluss über der Mitralklappe und die Myokardbewegungen am Mitralanulus bestimmt.

Für die Echokardiographie ist es notwendig, das Versuchstier (meist Ratten) für bis zu 25 Minuten zu narkotisieren, was einen Einfluss auf das Outcome haben könnte. Des Weiteren

muss ein entsprechend hochwertiges Ultraschallgerät verfügbar sein, welches von einem sehr erfahrenen Operator bedient wird. Dadurch wird die maximale Anzahl der parallel betrachteten Versuchstiere stark reduziert.

Ein weiteres Verfahren zur Risikostratifizierung ist die invasive Messung von Puls, Temperatur und Blutdruck über intraarterielle Katheter. Diese Messungen sind wiederum sehr aufwendig, da zum einen die Versuchstiere eine Betreuung rund um die Uhr benötigen und zum anderen entsprechende Geräte in entsprechender Anzahl vorhanden sein müssen. Außerdem muss ein mit der Führung von intensivmedizinisch zu versorgenden Versuchstieren vertrauter Operator die ganze Zeit anwesend sein.

Der Belastungsgrad für die Versuchstiere aus ethischer Sicht ist in diesen Versuchsreihen aufgrund der vorherigen Implantation und Einheilungsphase enorm. Des Weiteren existiert auf Grund der eingebrachten intravasalen Katheter und der maschinellen Beatmung ein beträchtlicher Bias in den Messwerten. Letztendlich ist nicht zu eruieren, inwiefern pathophysiologische Veränderungen der gemessenen Parameter auf das invasive Monitoring und welche auf die beobachtete Sepsis zurückgehen.

Nichtsdestotrotz konnte mittels dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass der septische Schock auch im Kleinnager-Modell mit einer signifikanten Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks und dem systolischen linksventrikulären Druck einhergeht. Des Weiteren wird analog zur Echokardiographie auch über diese Methoden eine erniedrigte Ejektionsfraktion gemessen. Demgegenüber ist der enddiastolische linksventrikuläre Blutdruck erhöht, was auf eine hypokinetische Störung des Myokards schließen lässt. Auch dieser Befund zeigte sich ebenso in der Echokardiographie. Um die Insuffizienz des Ventrikelmyokards zu kompensieren steigt die Herzfrequenz, was wiederum die Myokardperfusion verringert und zum Anstieg von kardiospezifischen Markern im Blut führt (Panayiotou et al. 2010, Kellum et al. 2004, Wang et al. 2006, Chopra und Sharma 2007, Feng et al. 2007, Lin et al. 2014).

Diese invasiven Methoden konnten sich jedoch bislang in der translationalen Forschung nicht durchsetzen, da alle mit hohem logistischem und personellem Aufwand (Transport, Messung, Auswertung, Entscheidungsfindung) und einer zusätzlichen Belastung der Versuchstiere verbunden sind (Manipulationen, Blutentnahmen, Narkosen).

Aus diesem Grund wurden bereits seit längerer Zeit eine Reihe von Surrogatparametern untersucht, welche über eine nicht invasive und nicht aufwendige Technik quantitative abschätzbare Informationen über den Gesundheitszustand eines Versuchstieres im Rahmen der systemischen Infektion liefern sollten.

Das Körpergewicht der Versuchstiere ist ein solcher Surrogatparameter, der standardmäßig in den Versuchsprotokollen der Operatoren bei der täglichen Inaugenscheinnahme erfasst wird. Jedoch ist die Detektion dieses Parameters nicht kontinuierlich möglich und das Handling des Tieres ist wieder ein gewisser Stressfaktor, abhängig von der Routine des Operators. Eine Untersuchung des Gewichtes als prädiktivem Faktor für das Überleben oder Versterben von Versuchstieren gab einen Gewichtsverlust von 0,05 Gramm pro Tag nach einer initialen Gewichtszunahme als Prädiktor für das Versterben des Versuchstieres mit einer Spezifität von 96 % an (Hankenson et al. 2013). Bei der Analyse der eigenen Resultate im Ergebnisteil (Kapitel 4.8) ließ sich während der für diese Promotionsarbeit gelaufenen Versuche jedoch dieser prädiktive Wert nicht bestätigen. Im Gegensatz dazu erlangte die Messung des Körpergewichts weder eine Korrelation mit dem Outcome des Versuchstieres noch ließ sich ein objektiver Ansatz für eine Vorhersagevalidität zu irgendeinem beliebigen Versuchszeitpunkt finden.

## **5.2 Stratifizierung mittels manueller Temperaturerfassung**

Die bisherige tierexperimentelle Anwendung von Temperaturmessungen erfolgt meist unter Anwendung invasiver telemetrischer oder rektaler Messtechniken.

Die Kontaktmessung mittels einem konventionellen Thermometer ist für das Tier belastend, da ein individuelles Handling und Restraining (Einzwängen des Tieres mittels Zwangsgriff) erforderlich ist. Außerdem ist die rektale Ableitung ein invasiver Eingriff und sehr wahrscheinlich belastend für das Versuchstier.

Manuelle Infrarotthermometer (Hand-Held-Geräte) sind weniger invasiv, da diese die vom Versuchstier emittierte Oberflächenstrahlung detektieren und in eine Oberflächentemperatur umsetzen (Adamson et al. 2013). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass bei dem Gerät keine Aufwärmzeit vorhanden ist und dem Tier keine Wärme entzogen wird. Aus physikalischen Gründen wird jedoch nur die Körperschalentemperatur an einem Punkt der Mausoberfläche ermittelt, welche aber gut mit der Körperkerntemperatur korreliert (Newsom et al. 2004). Die Einschränkung dieser Methode ist jedoch, dass die Tiere wiederum einem individuellen Handling und Restraining ausgesetzt sind. Zudem besteht eine weitere Schwierigkeit darin, das Messgebiet auf der Körperoberfläche des Versuchstieres exakt zu definieren, da diese über die Körperoberfläche des Versuchstieres stark variiert (Newsom et al. 2004). Des Weiteren ist diese Methode auf Grund der Diskontinuität der Messwerterfassung in der Aussagekraft eingeschränkt.

Eine weitere Methode der Temperaturerfassung besteht darin, dass ein Thermotransmitter subkutan bei dem Versuchstier implantiert wird (Molins et al. 2012). Dies reduziert die bei der vorherigen Methode genannte Problematik der Definition des Messgebietes, beinhaltet jedoch zusätzliche Schwierigkeiten. Da der Transmitter in einem invasiven Eingriff implantiert werden muss, besteht ein nicht abzuschätzendes Infektionsrisiko und damit mögliche Confounder sowie das Risiko eines zusätzlichen Eingriffes, welcher in einem bestimmten Zeitabstand vor dem Versuch durchgeführt werden muss.

Trotz bestehender technischer oder methodischer Limitationen hat die Temperaturmessung mittels Handthermometer oder implantierten Thermotransmittern Eingang in die Charakterisierung der Wirtsreaktion bei viralen, fungalen oder bakteriellen Infektionen gefunden (Bast et al. 2004, Molins et al. 2012, Warn et al. 2003, Hankenson et al. 2013, Drechsler et al. 2015, Raeven et al. 2012, Raeven et al. 2013).

### **5.3 Stratifizierung durch automatisierte Infrarothermographie**

Die Zielsetzung dieser Dissertation war die Entwicklung und Evaluierung einer kontinuierlichen, automatisierten, kontakt- und somit stresslose Erfassung der Körperoberflächentemperatur zur Differenzierung von überlebenden und versterbenden Versuchstieren im Infektionsmodell der polymikrobiellen abdominellen Infektion im Rahmen der Sepsis. Diese Methode sollte weiterhin auf verschiedenen Schweregraden, verschiedenen Genotypen als auch diverse Interventionen abbilden können.

Die Erfassung der Oberflächentemperatur ist ohne feststellbare Beeinflussung der Experimente gelungen. Sollte es nicht detektierte Effekte gegeben haben, sind diese jedoch geringer ausgefallen als dies bei den bisher verwendeten Stratifizierungsmethoden der Fall gewesen wäre.

Auch die für die Detektion von individuellen Temperaturprofilen notwendige Einzelhaltung der Versuchstiere beeinflusste die Experimente nicht negativ. Während bei konventionellen Käfigen die Versuchstiere in kleinen Gruppen gehalten werden, wodurch die Tiere ein als *gathering* bezeichnetes Sozialverhalten aufbauen und erhalten können. Dies führt aber dazu, dass die kranken Tiere sich mikrobiell und sozial in diesen Versuchen gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren können nur Versuchstiere, welche bereits vor Versuchsbeginn in einem Käfig waren, auch danach in einem Käfig observiert werden, da ansonsten ein Revierverhalten bis hin zu Machtkämpfen unter den Mäusen zu beobachten ist. Diese Effekte bestehen unter den verwendeten Einzelkäfigen nicht. Nach Angaben von verschiedenen Experimentatoren sowie den beteiligten Medizinisch-Technischen-Assistenten war diese

Haltungsform tendenziell eher positiv für das Überleben der Versuchstiere. Mutmaßlich könnte dieser Effekt durch die in diesen Käfigen bessere Erreichbarkeit von Futter und Trinkwasser auf der Höhe des Käfigbodens relevant sein. Denn in den Standard-Haltungskäfigen müssen sich die Tiere auf die Hinterbeine stellen und strecken, um an Nahrung und Trinkwasser zu gelangen. Nichtsdestotrotz ist bei weiteren Entwicklungen durchaus zu avisieren, dass wieder eine Form der Gruppenhaltung ermöglicht werden sollte. Hierzu müssen jedoch Voraussetzungen für die non-invasive visuelle Verfolgbarkeit und Identifizierbarkeit einzelner Versuchstiere geschaffen werden.

Durch den angewendeten Algorithmus der Datenerfassung konnte die Datenmenge in praktikablen Umfängen gehalten werden, ohne jedoch an Aussagekraft und Präzision einzubüßen. Gleichfalls konnte hierdurch die Stabilität des Datenverarbeitungssystems verbessert werden.

Weiterhin geben die Daten keinen Hinweis auf übermäßigen Stress für die Versuchstiere additiv zu den belastenden Versuchen im Rahmen der translationalen Sepsisforschung. Ein weiterer Hinweis hierfür ist, dass nach einer initialen inflammatorischen Phase relativ zügig wieder ein stabiler zirkadianer Rhythmus detektiert werden konnte.

Die angestrebte Differenzierung zwischen überlebenden und versterbenden Versuchstieren gelingt sehr zuverlässig. Die Thermographie ist den bisher verwendeten nicht-invasiven Parametern Clinical Severity Score und Körpergewicht in Validität und Vorhersagepräzision überlegen. Außerdem hat sich gezeigt, dass das automatisierte Infrarotmonitoring unabhängig von Schweregrad, Genotyp und eingesetzter Intervention sehr valide funktioniert. Gleichfalls ist es jedoch sensibel genug, um Unterschiede zwischen den Subgruppen zu detektieren und in Korrelation mit anderen Parametern wertvolle Hinweise auf die Pathophysiologie der generalisierten Entzündungsreaktion zu geben.

Abschließend soll die automatisierte Infrarotthermographie noch mit den bisher angewandten Stratifizierungsmethoden verglichen werden.

Die Arbeitsgruppe um M. F. Osuchowski et al., welche die Stratifizierung mittels der ein- bzw. mehrmaligen Analyse vom Zytokin IL-6 herbeiführt, verfolgt einen anderen Zeitansatz als die automatisierte Infrarotthermographie.

Beide Stratifizierungsmethoden differenzieren mit guten prognostischen Werten zwischen überlebenden und versterbenden Versuchstieren. Die Arbeitsgruppe von Osuchowski et al. bestimmt das IL-6 zum Zeitpunkt 6 Stunden post-CLP mittels eines dual-Cut-Off. Das bedeutet, dass es einen unteren Schwellenwert gibt, unter welchem die Tiere eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit haben, zu überleben und einen oberen Schwellenwert, über

welchem die Tiere eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, zu versterben. Dazwischen existiert ein Graubereich, welcher als indifferent angesehen wird und welcher folglich schwer zu analysieren ist.

Demgegenüber differenziert die automatisierte Thermographie im laufenden Versuch über einen Zeitraum zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Versuch bis zu 24 Stunden vor dem Tod des Tieres zwischen Überlebenden und Versterbenden.

Der Unterschied hierbei ist, dass bei der Messung von IL-6 mit dem dual-Cut-Off bereits 6 Stunden nach Versuchsbeginn eine valide Differenzierung vorliegt, dieses Verfahren aber nicht in der Lage ist, zu bestimmen, wann der Tod des Tieres eintreten wird. Die automatisierte Thermographie kann auf Grund der initialen Heterogenität der Temperaturverläufe am Anfang des Versuches insbesondere bei Antibiotikagabe nicht sauber den Verlauf prognostizieren. Jedoch kann bis zu 24 Stunden im Voraus der negative Verlauf eines Versuchstieres mit hoher Sicherheit beobachtet und vorhergesagt werden. Somit ist eine ungefähre Prognose des Versterbezeitpunktes möglich, unabhängig von der Vorhersage, dass ein Versuchstier versterben wird. Bemerkenswert hierbei ist, dass der von Osuchowski (zufällig/empirisch) gewählte Zeitpunkt der Blutentnahme 6 Stunden post interventionem mit dem ersten Abfall und der Talsohle unseres Monitoringsystems übereinstimmt. Dies spricht für die biologische Verknüpfung beider Parameter in der Pathophysiologie der Sepsis im murinen Modell.

Bast et al. bestimmt die Körperoberflächentemperatur der Versuchstiere über ein Hand-Held-Infrarotthermometer. Als Unterscheidungskriterium zwischen überlebenden und versterbenden Versuchstieren wird eine Oberflächentemperatur von  $\leq 30^\circ\text{C}$  beschrieben.

Grundsätzlich konnte die Theorie der Prognose des Versterbens über die Körperoberflächentemperatur sowie auch der Cut-Off bestätigt werden, jedoch differiert der Absolutbetrag des Cut-Off-Wertes zwischen beiden Systemen auf Grund der unterschiedlichen Messwertaufnahme- und -verarbeitung (beim automatisierten Infrarotmonitoring  $28,7^\circ\text{C}$ ).

Jedoch führt diese Arbeitsgruppe die Messungen nur mit dem großen Messintervall von zwei Messungen pro Tag durch, was im Gegensatz zum Infrarotmonitoring keine Aussage zu Temperaturkinetiken zulässt und auch im prognostischen Vorhersagezeitraum nicht die Aussagekraft generiert. Die Messwertaufnahme bei dieser Methode wird durch ein Anheben des Gesäßes erreicht, um den in dieser Studie definierten Messpunkt am Abdomen zu erreichen, was wiederum Stress für die durch die Versuche sowieso bereits belasteten Tiere bedeutet. Des Weiteren dürfte sich die exakte Einhaltung des Messortes und der vorgeschriebenen Messdistanz von 15,2 cm (6 inch) bei mobilen Versuchstieren in der

Praxis als sehr schwierig erweisen. Dies ist jedoch vor dem Hintergrund der physikalischen Abhängigkeit der detektierten Temperatur von der Messentfernung von hoher Relevanz.

Hankenson et al. praktiziert die Temperaturmessung mittels implantiertem Chip. Diese Invasivität ist jedoch vor dem Hintergrund der später stattfindenden genauen Detektion der verschiedenen Marker und Zytokine nachteilig. Schließlich provoziert ein eingebrachter Fremdkörper selbst eine Immunreaktion, abgesehen von Infektionen und Komplikationen (Abszesse, Blutungen etc.). All dies kann wiederum die Messwerte, im gravierendsten Fall sogar den Ausgang des Experiments beeinflussen. Des Weiteren wird bei der Arbeitsgruppe von Hankenson et al. die Temperatur wiederum nur 1 - 2 mal pro Tag erhoben, was nur eine eingeschränkte Aussagekraft bezüglich Prognose und Temperaturverlauf zulässt. Jedoch entfällt bei dieser Messmethode die Unsicherheit der Wahl des Detektionsortes und des genauen Abstandes, da die eigentliche Messwertgenerierung im Chip stattfindet und dieser nur den Zahlenwert übermittelt.

Diese Arbeitsgruppe fand auch eine gute Korrelation zwischen den invasiv gemessenen Temperaturwerten und den mittels Handinfrarotthermometer gemessenen Körperoberflächentemperaturen. Hierbei wurde die Körperoberflächentemperatur in einem definierten Bereich zwischen den Schulterblättern gemessen, was bezüglich der Genauigkeit und Verlässlichkeit des detektierten Ortes für die Auswertung bei vitalen und mobilen Versuchstieren sehr schwierig sein dürfte. Die invasiv subkutan gemessene Temperatur wurde im Mittel mit  $36,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  bestimmt, während die gleichzeitig detektierte Körperoberflächentemperatur  $34,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  betrug.

Diese Temperaturwerte decken sich mit den ersten Messungen mit dem Thermographiesystem, bei welchen die Temperatur mittels der Software von FLIR über einem definierten Bereich zwischen den Schulterblättern abgeleitet wurde. Die in dieser Arbeitsgruppe gemessene Subkutantemperatur korreliert mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,8 bei  $p < 0,0001$  mit der Körperoberflächentemperatur.

Daher kann man die Vorhersagekraft und die Kinetiken der subkutan gemessenen Temperatur mit der Körperschalentemperatur gleichsetzen. Das bedeutet allerdings auch, dass dies kein sicherer Indikator für die Körperkerntemperatur des Versuchstieres ist. Die Kreislaufzentralisation im Schock wird analog zu der hier vorgestellten Methode detektiert, sodass auch hier Rückschlüsse auf den Verlauf des septischen Schocks möglich sind.

Des Weiteren erkannte diese Arbeitsgruppe eine Korrelation zu einem Gewichtsverlust von über 0,05 Gramm pro Tag nach einer initialen Gewichtszunahme. Dieses Ergebnis konnte in den dieser Dissertation zugrunde liegenden Versuchen nicht reproduziert werden. Eine

Erklärung hierfür könnte das unterschiedliche Infektionsmodell sein. Während im CSCC mit dem Modell der polymikrobiellen peritonealen Sepsis über eine intraperitoneale Injektion einer Faeceslösung gearbeitet wird, arbeitete diese Arbeitsgruppe mit der Einimpfung von Herpes-simplex-Viren.

Die automatisierte Infrarotthermographie erreicht über einen sehr langen präfinalen Zeitraum (50 Stunden) signifikante Vorhersagewerte mit engem Konfidenzintervall, welches innerhalb der letzten 18 Stunden von  $AUC = 0,75$  auf  $AUC > 0,9$  ansteigt. Das Überleben bzw. Versterben eines Versuchstieres kann ab 12 Stunden vor dem Tod/Versuchsende mit einer AUC von 0,95 prädiziert werden. Nach Erreichen des Cut-Off-Wertes wiederum versterben 50 % der Versuchstiere innerhalb von 23 Stunden. Dies sind für eine nicht-invasive Methode zur Prognosestratifizierung respektable Werte, insbesondere da diese deutlich besser und genauer sind als der CSS-Score und das Körpergewicht.

Während das Körpergewicht zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Ergebnis erreicht, erzielt der CSS-Score 12 h vor dem Tod eine AUC von 0,93. Dies scheint der Infrarotthermographie gleichwertig, jedoch ist die Anzahl der Messwerte (alle 6 - 12 h) und Graduierungen (1 - 4) sehr gering, sodass der tatsächliche praktische Nutzen kleiner ist, als dies auf den ersten Blick erscheint.

Aber auch innerhalb der anderen vorgestellten Parameter ist die Vorhersagegenauigkeit der Infrarotthermographie beachtlich, da diese zwar häufig SUR und NON-SUR ähnlich präzise trennen können, jedoch eine genauere Prognose des Versterbezeitpunktes nicht besser möglich ist.

Aus den dargelegten Fakten ist die automatisierte Infrarotthermographie besser als die bisher angewendeten nicht-invasiven Prognoseparameter und eine gute und tierschutzgerechte Alternative zu den invasiven Messmethoden. Weitere exklusive Vorteile der kontaklosen Infrarotthermographie sind:

a) Kontinuierliche Messwertgenerierung: Während bei den meisten alternativen Stratifizierungsmethoden lediglich Einzelmessungen generiert werden, welche insbesondere bei den Blutparametern eine mehr oder weniger aufwendige Analyse benötigen, werden bei der Infrarotthermographie ständig Messwerte erhoben. Diese wiederum erlauben die Interpretation von Temperaturverläufen und den ständigen Abgleich mit den Cut-Off-Werten. Im Vergleich ist es bei den anderen Messmethoden nicht möglich, bei ein- bis viermal am Tag erhobenen Messwerten eine Kinetik zu erkennen. Außerdem sinkt die praktische Vorhersagegüte dadurch, dass Veränderungen, welche kurz nach dem letzten Messzeitpunkt auftreten, bis zum nächsten Messzeitpunkt plus Analysezeitdauer unbemerkt bleiben.

Daher bietet die Infrarotthermographie den Vorteil der Live-Auswertung von Experimenten mit der jetzt verfügbaren Möglichkeit, ohne invasive Maßnahmen auf Versuchstiere im Versuch gezielt und analog zur klinischen Intensivtherapie einzuwirken. Dies wiederum könnte in Zukunft die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der tierversuchsbasierten Grundlagenforschung in den klinischen Alltag verbessern.

b) Neue Datenqualität bzw. neue Dimension der Differenzierung in Tierversuchen: Bislang werden Tierversuche in einem Querschnittsdesign durchgeführt. Das bedeutet, es wird in einer Versuchsgruppe nicht nach dem Schweregrad differenziert und alle Tiere dieser Versuchsgruppe werden zusammen ausgewertet. Es wird jedoch nicht nach dem Schweregrad der Erkrankung der Versuchstiere unterschieden. Somit werden Versuchstiere mit akuten Verläufen und raschem Versterben zusammen mit Tieren ausgewertet, welche bspw. einen eher postakuten Verlauf der Sepsis zeigen. Diese Divergenz des Gesundheitszustandes von Versuchstieren (siehe Kapitel 4.4, Abb. 16) innerhalb einer Versuchsreihe geht aus den hier erhobenen Daten eindeutig hervor. Zu bedenken ist jedoch, dass dieser heterogene Verlauf in normalen Versuchsdesigns ignoriert wird und somit die Versuchstiere bezüglich ihres wahrscheinlichen Verlaufes falsch stratifiziert würden. Zusätzlich können bei korrekter Stratifizierung neue Erkenntnisse zur Resolution des septischen Multiorganversagens bzw. des septischen Schocks gewonnen werden, welche ansonsten bei der großen interindividuellen Variabilität der Versuchstiere in einer Versuchsgruppe nicht ausgewertet werden könnten.

c) Ubiquitäre Verfügbarkeit der Messdaten: Durch die computergestützte automatisierte Messwerterfassung bietet die Infrarotthermographie einen Vorteil, welche die anderen Methoden nie erreichen können – die Messdaten sind ohne weitere manuelle Manipulation von jedem beliebigen Ort mit Internetverbindung und auf jedem beliebigen Endgerät (bspw. über TeamViewer<sup>®</sup>) verfügbar. Dies ermöglicht den Versuchsleitern, stets die aktuellen Entwicklungen des Experimentes nachzuverfolgen und zielgerichtet eingreifen zu können. Außerdem können die aktuellen Daten auch ohne ständige Präsenzzeit ausgewertet und diskutiert sowie bei persönlicher Abwesenheit der protokollgemäße Ablauf kontrolliert werden.

d) Benachrichtigungsfunktion: Anschließend an die ubiquitäre Verfügbarkeit der Messdaten ist es mit der Infrarotthermographie ebenfalls möglich, sich bei bestimmten Ereignissen während des Versuchsablaufs über die verschiedenen Endgeräte mobil benachrichtigen zu lassen. Diese Funktion geht weit über die einfachen Versuchsschritte wie etwaige Unterbrechungen zu Interventionen hinaus – vielmehr geht es um die Alarmierung des Versuchsleiters bei vorher definierten Versuchseignissen wie bspw. das Erreichen ei-

nes Cut-Offs oder sogar die Änderung der Prognosekategorie. Bei den durchgeführten Experimenten wurde der Versuchsleiter bspw. per Email benachrichtigt, wenn ein bestimmtes Versuchstier dauerhaft seinen Temperaturkorridor verlassen hat, sodass bereits vor Erreichen des eigentlich statistisch abgesicherten Cut-Offs eine Vorwarnung bezüglich des kritischen Gesundheitszustandes eines Tieres innerhalb des Experimentes gegeben wurde. Somit wird die Möglichkeit gegeben, nicht nur als versterbend klassifizierte Versuchstiere aus dem Experiment zu nehmen, sondern auch die gezielte Intervention an kritisch kranken Versuchstieren vorzunehmen. Diese Funktion in Kombination mit der Live-Auswertung ermöglicht vollständig neue Versuchsprotokolle, welche in Hinsicht auf die klinische Übertragbarkeit eine neue Realität und Relevanz haben.

e) Lückenlose Protokollführung: Bei der Infrarotthermographie entfällt die manuelle Eingabe der Daten durch automatische und überprüfbare Abspeicherung des Messsystems. Somit ist zum einen eine mögliche Fehlerquelle bei der manuellen Übertragung eliminiert, aber auch die Möglichkeit der unbemerkten manuellen Beeinflussung genommen. Weiterhin können aber auch aus nicht beeinflussbaren Gründen aus dem Versuch oder der Auswertung herauszunehmende Tiere nachvollziehbar begründet werden.

Die Limitation der automatisierten Infrarotthermographie ist, dass hiermit kein suffizientes Filtern der nicht überlebenden Versuchstiere länger als 24 Stunden vor dem Tod möglich ist. Dies wird jedoch durch das sehr effiziente Erkennen von versterbenden Versuchstieren zu einem beliebigen Zeitpunkt im Experiment bis zu 24 Stunden vor dem Tod wettgemacht. Die Prognose länger als 24 Stunden ist mit der IL-6-gesteuerten Methode von Osuchowski et al. möglich. Jedoch generiert diese nur die Aussage, dass ein Tier im Verlauf des Experiments sterben wird, jedoch nicht wann. Mit der automatisierten Infrarotthermographie ist eine Eingrenzung des Zeitraums des Versterbens möglich. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie der jeweiligen Vor- und Nachteile sind in Tab. 3 ersichtlich.

Des Weiteren besteht das Problem, dass es in Einzelfällen unter antibiotischer Therapie Temperaturverläufe gibt, welche über einen langen Zeitraum (mitunter mehrere Tage) auf einem sehr niedrigen Temperaturniveau mit eingeschränkter Lokomotion überleben, sodass man diese Tiere ohne direkte Inaugenscheinnahme wahrscheinlich falsch als verstorben klassifiziert hätte. Hier liegen wahrscheinlich auch die Grenzen des Surrogatparameters Körperoberflächentemperatur. Daher ist es wichtig, dass diese technische Methode nur im Zusammenspiel mit der direkten visuellen und taktilen Inaugenscheinnahme die höchste Präzision erreicht, aber diese manuelle Überprüfung nicht vollständig ersetzen kann oder soll.

Kriterium	Körpergewicht	CSS-Score	Zytokine	AUGUR 2.0
Invasivität	gering	gering	hoch	gering
Aufwand	gering	gering	hoch	gering
Validität	keine	mittel	mittel-hoch	hoch
Kontinuität	nein	nein	nein	ja
weitere Vorteile	normale Gruppeninteraktion	normale Gruppeninteraktion	normale Gruppeninteraktion; objektive Daten	objektive Daten; kontinuierliche Messwertaufzeichnung; sichere Dokumentation; weltweite Abrufbarkeit der Daten
weitere Nachteile	keine Vorhersage möglich	subjektive Entscheidungsfindung; keine objektiven Daten	nicht im Einklang mit den 3R	(noch) keine normale soziale Interaktion

**Tabelle 3:** Vor- und Nachteile der verschiedenen Stratifizierungsmethoden

Außerdem waren die hier ausgewerteten Versuchsreihen hinsichtlich der Thermographie zur Überprüfung der Machbarkeit (proof-of-principle) ausgelegt. Es werden ergänzende prospektive Studien mit Validierungskohorten notwendig sein, um die Anwendbarkeit und den diagnostischen Nutzen abschätzend bewerten zu können.

Neue Methoden in der tierversuchsbasierten Grundlagenforschung werden vor dem Hintergrund der negativen öffentlichen Wahrnehmung und den sich verschärfenden Regularien für Tierversuche zunehmend kritisch gesehen. Aus diesem Grund müssen die durchgeführten Tierversuche ein Maximum an Daten aus einem Versuchsdurchlauf generieren und dies möglichst ohne den Tieren zusätzlichen Schaden zuzufügen. Die Zeiten, als die Maxime galt, dass für einen Versuchsendpunkt ein Versuchstier verwendet werden sollte, sind aufgrund der vermehrten Tierschutzbestimmungen nach dem 3R-Prinzip vorbei. Heute sollten möglichst viele unterschiedliche Messungen an einem Versuchstier durchgeführt werden, ohne jedoch Einfluss auf den Ausgang nehmen zu wollen. Dieses Dilemma ist mit den bisherigen Methoden unzureichend gelöst und daher bedarf es der Entwicklung von nicht invasiven Maßnahmen zur Beurteilung von Versuchstieren. Nichtsdestotrotz sind Tierversuche elementarer Bestandteil der translationalen Forschung, denn wie Takao et al. 2015 im Kontrast zu Seok et al. feststellten: „Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases“ (Takao und Miyakawa 2015, Seok et al. 2013). Vor

diesem Hintergrund ist die Methode des automatisierten Infrarotmonitorings ein nützliches Add-On zu bisherigen Versuchsmethoden aus den folgenden Gründen:

a) Die Versuchstiere zeigen kein schlechteres Überleben in dem entwickelten Versuchsaufbau. Die Messmethode erzeugt keine zusätzlichen Schmerzen und keinen zusätzlichen Stress durch kontaktlose Erfassung der Körperoberflächentemperatur. Die Tiere haben durch die frühzeitige Erkennung des Einsetzens des Sterbevorgangs und die somit mögliche frühzeitige Entfernung aus dem Versuch ein reduziertes Leiden. Außerdem können aus den versterbenden Tieren nun noch Blut und Organe für weitergehende Analysen entnommen werden, was wiederum die benötigte Tieranzahl reduziert.

b) Aus wissenschaftlicher Sicht können ohne Beeinträchtigung des Versuchsausganges zuverlässig mittelfristig (rund 24 Stunden Prädiktion) die überlebenden von den versterbenden Versuchstieren getrennt werden. Zusätzlich können zu jedem beliebigen Zeitpunkt von jedem beliebigen Ort (mobiles User-Interface) Aussagen über den Gesundheitszustand des einzelnen Tieres getroffen werden. Des Weiteren können auch Vorhersagen zu seinem Sterbezeitpunkt getroffen werden. Außerdem ist es möglich, zustandsgesteuerte Interventionen durchzuführen, um die erhobenen Daten somit spezifisch einer Subgruppe (SUR vs. NON-SUR) zuzuordnen und diese Gruppen nicht miteinander zu vermischen. Dies ist ein Schritt für den Weg zu einer mit dem klinischen Alltag vergleichbaren zielgesteuerten Therapie bzw. Therapieansätzen, ohne den Versuchsablauf im weiteren negativ zu beeinflussen.

c) Im Sinne der guten wissenschaftlichen Arbeit, welche wiederholt im Bereich der translationalen Forschung kritisiert wird (Holman et al. 2016, Iqbal et al. 2016) sowie der ausbleibenden Erfolge im Rahmen der translationalen Sepsisforschung was die Entwicklung von zielführenden Therapieansätzen aus der Grundlagenforschung (Seok et al. 2013) anbelangt, ist diese Technologie ein Fortschritt im Sinne der Nachvollziehbarkeit und Datensicherheit/überprüfbarkeit. Außerdem können mit dem automatisierten Monitoring eventuell aus der statistischen Auswertung herausgenommene Tiere nachträglich überprüft bzw. mittels Sachargumenten belegt werden. Zusätzlich würden lückenhafte Auswertungen und Protokolle sowie mangelnde Sorgfalt stärker auffallen und nur gut und diszipliniert arbeitende Forschergruppen könnten entsprechende Tierversuche durchführen und entsprechend hochwertig publizieren.

## 6 Schlussfolgerungen und Perspektive

Für die translationale Forschung insbesondere in der Sepsisforschung bestehen in der Zukunft große Herausforderungen, welche sich aus tatsächlichen oder scheinbaren Misserfolgen der Übertragbarkeit der Daten in den klinischen Alltag sowie einem stärker wahrgenommenen Schutzbedürfnis der Versuchstiere resultieren. Ein wesentlicher Aspekt, Tierversuche besser und übertragbarer zu gestalten ist die Prognosestratifizierung von Versuchstieren während eines laufenden Versuches, um diese Vorhersage in die getestete Intervention einfließen zu lassen.

Die bisher verwendeten Methoden jedoch sind entweder nicht-invasiv und nicht präzise genug oder invasiv und erhöhen das Leiden der Versuchstiere. Dieser Gesichtspunkt wird vor der gesellschaftlichen Diskussion über die erlittenen Belastungen der Versuchstiere bei Tierversuchen sowie die sich verschärfenden Regularien zur Genehmigung von Tierversuchen deutlich an Wert gewinnen – hierbei haben selbstredend Verfahren, welche eine zusätzliche Belastung für die Versuchstiere bedeuten (z. B. durch Blutentnahmen) grundsätzlich schlechtere Voraussetzungen zur Durchsetzung.

Die eingangs formulierten Hypothesen konnten bestätigt werden:

- Mit der kontinuierlichen Infrarotthermographie kann eine frühzeitige, valide und praktikable Prognosestratifizierung in überlebende und versterbende Versuchstiere durchgeführt werden.
- Diese Methode ist dabei genauer und valider als die bisher verwendeten nicht-invasiven Stratifizierungsmethoden.
- Diese Infrarotthermographie ist den invasiven Stratifizierungsmethoden wenigstens gleichwertig bei geringerem Aufwand und effizienterer Umsetzung.
- Es können pathomechanisch bedeutsame Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsmodellen detektiert werden, ohne dass dies die Prognosevalidität bezüglich des primären Endpunktes einschränkt.
- Es können lückenlos automatisiert Datensätze generiert werden, welche den Versuchsablauf dokumentensicher nachvollziehbar machen.
- Die Tierversuche können von jedem beliebigen Ort aus telekommunikativ überwacht und entsprechende Interventionen eingeleitet werden.

- Die verwendete Technik beeinflusst den Versuchsablauf nicht und hat keinen Einfluss auf die Mortalität in den Versuchen.
- Tierversuche werden ohne Zeitverzug beurteilbar – es kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt auf nicht beeinflussbare Schwankungen reagiert werden und das Modell wird im Gegensatz zu outcome-getriebenen Modellen schweregradjustierbar.

Bei der Weiterentwicklung sollte das Hauptaugenmerk darauf liegen, im Sinne der Tierschutzkriterien auch während der Versuche die soziale Interaktion durch mehrere Tiere in einem Käfig zu ermöglichen. Dies bedarf jedoch einer nicht-invasiven und das Versuchstier nicht beeinträchtigenden (also wahrscheinlich optischen) Funktion, ein Versuchstier während eines Versuches in der Mäusegruppe zuverlässig zu identifizieren und kontinuierlich zu verfolgen. Des Weiteren könnte in diesem Zusammenhang zugleich der Parameter der Lokomotion mit abgebildet werden, um sozusagen die Einschränkung des Bewegungsradius als zusätzliches Kriterium für den primären Endpunkt zu betrachten. In Kombination der Oberflächentemperatur sowie der Häufigkeit und Intensität der sozialen Kontakte ließe sich hierbei der Vorhersagealgorithmus noch verfeinern bzw. der Vorhersagezeitraum vergrößern.

Abschließend ist zu konstatieren, dass die automatisierte Infrarotthermographie als eine nicht-invasive und kontinuierliche Messmethode, welche tierschutzrechtlichen Vorzüge mit der präzisen Prognosestratifizierung eines objektiv erfassbaren Messparameters verbindet, in dem Spannungsfeld der Notwendigkeit und Umsetzung von Tierversuchen ein Ansatz zur Lösung des Problems ist.

Die Vorhersagekraft ist den anderen nicht-invasiven Messmethoden deutlich überlegen und gleich gut oder sogar besser als viele invasiv gemessene Parameter wie Procalcitonin und IL-6.

Kombiniert mit der automatisierten Datenerfassung und -protokollierung im Sinne der verbesserten Datenqualität, der tierschutzgerechten Möglichkeit der kontinuierlichen Einschätzung der Belastung der Versuchstiere, dem weltweiten Zugriff auf die aktuellen Versuchsmesswerte sowie den vielfältigen Benachrichtigungsfunktionen ist diese Methode einzigartig und derzeit ohne adäquate Alternative.

**Literaturverzeichnis**

- Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL, Administration of Drotrecogin Alfa in Early Stage Severe Sepsis Study G. 2005. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med*, 353(13):1332–41.
- Adamson TW, Diaz-Arevalo D, Gonzalez TM, Liu X, Kalkum M. 2013. Hypothermic endpoint for an intranasal invasive pulmonary aspergillosis mouse model. *Comp Med*, 63(6):477–81.
- Amtsblatt der Europäischen Union, Richtlinie 2010/63/EU. 2010. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt der Europäischen Union*.
- Angus DC. 2011. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA*, 306(23):2614–5.
- Bast DJ, Yue M, Chen X, Bell D, Dresser L, Saskin R, Mandell LA, Low DE, de Azavedo JC. 2004. Novel murine model of pneumococcal pneumonia: use of temperature as a measure of disease severity to compare the efficacies of moxifloxacin and levofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9):3343–8.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*, 55(8):835–45.
- Beraud AS, Guillaumet CV, Hammes JL, Meng L, Nicolls MR, Hsu JL. 2014. Efficacy of transthoracic echocardiography for diagnosing heart failure in septic shock. *Am J Med Sci*, 347(4):295–8.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher J C J, Recombinant human protein CWEiSSsg. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344(10):699–709.
- Biju PG, Garg S, Wang W, Choudhry MA, Kovacs EJ, Fink LM, Hauer-Jensen M. 2012. Procalcitonin as a predictive biomarker for total body irradiation-induced bacterial load and lethality in mice. *Shock*, 38(2):170–6.

- Bundesanzeiger Verlag, TierSchVersV. 2013. Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV). Bundesanzeiger Verlag.
- Buzug TM. 2007. Infrarot-Bildgebung, book section 20. Springer Berlin Heidelberg, 367–373.
- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1):277–359.
- Chopra M, Sharma AC. 2007. Distinct cardiodynamic and molecular characteristics during early and late stages of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Life Sci*, 81(4):306–16.
- Craciun FL, Iskander KN, Chiswick EL, Stepien DM, Henderson JM, Remick DG. 2014. Early murine polymicrobial sepsis predominantly causes renal injury. *Shock*, 41(2):97–103.
- Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. 2010. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol*, 185(11):6930–8.
- Cressey D. 2011. Animal research: Battle scars. *Nature*, 470(7335):452–3.
- Deans KJ, Minneci PC, Eichacker PQ, Natanson C. 2004. The efficacy of drotrecogin alfa depends on severity of illness. *Crit Care Med*, 32(11):2347.
- Dellavalle B, Kirchhoff J, Maretty L, Castberg FC, Kurtzhals JA. 2014. Implementation of minimally invasive and objective humane endpoints in the study of murine Plasmodium infections. *Parasitology*:1–7.
- Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, Pettila V, Basson B, Brandt JT, Sundin DP, Levi M. 2004. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost*, 2(11):1924–33.
- Drechsler S, Weixelbaumer K, Raeven P, Jafarmadar M, Khadem A, van Griensven M, Bahrami S, Osuchowski MF. 2012. Relationship between age/gender-induced survival changes and the magnitude of inflammatory activation and organ dysfunction in post-traumatic sepsis. *PLoS One*, 7(12):e51457.

- Drechsler S, Weixelbaumer KM, Redl H, van Griensven M, Bahrami S, Osuchowski MF. 2011. Experimentally approaching the ICU: monitoring outcome-based responses in the two-hit mouse model of posttraumatic sepsis. *J Biomed Biotechnol*, 2011:357926.
- Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, Raeven P, Khadem A, Redl H, van Griensven M, Bahrami S, Remick D, Kozlov A, Osuchowski MF. 2015. Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. *Intensive Care Med Exp*, 3(1):48.
- Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. 2002. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(9):1197–205.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33(4):606–18.
- Everitt JI. 2015. The future of preclinical animal models in pharmaceutical discovery and development: a need to bring in cerebro to the in vivo discussions. *Toxicol Pathol*, 43(1):70–7.
- Feng X, Hu Y, Ding J, Ge Y, Song J, Ai Q, Zhang Z, Xu J. 2007. Early treatment with hydroxyethyl starch 130/0.4 causes greater inhibition of pulmonary capillary leakage and inflammatory response than treatment instituted later in sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. *Ann Clin Lab Sci*, 37(1):49–56.
- Fink MP. 2008. Animal models of sepsis and its complications. *Kidney Int*, 74(8):991–3.
- Fink MP, Warren HS. 2014. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov*, 13(10):741–58.
- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P. 1992. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*, 101(3):816–23.
- Gao M, Zhang L, Liu Y, Yang M, Wang N, Wang K, Ou D, Liu M, Chen G, Liu K, Xiao X. 2012. Use of blood urea nitrogen, creatinine, interleukin-6, granulocyte-macrophage colony

- stimulating factor in combination to predict the severity and outcome of abdominal sepsis in rats. *Inflamm Res*, 61(8):889–97.
- Gauvin DV, Tilley LP, Smith J F W, Baird TJ. 2006. Electrocardiogram, hemodynamics, and core body temperatures of the normal freely moving laboratory beagle dog by remote radiotelemetry. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 53(2):128–39.
- Gentile LF, Nacionales DC, Lopez MC, Vanzant E, Cuenca A, Szpila BE, Cuenca AG, Joseph A, Moore FA, Leeuwenburgh C, Baker HV, Moldawer LL, Efron PA. 2014. Host responses to sepsis vary in different low-lethality murine models. *PLoS One*, 9(5):e94404.
- Gonnert FA, Kunisch E, Gajda M, Lambeck S, Weber M, Claus RA, Bauer M, Kinne RW. 2012. Hepatic Fibrosis in a Long-term Murine Model of Sepsis. *Shock*, 37(4):399–407.
- Gonnert FA, Recknagel P, Hilger I, Claus RA, Bauer M, Kortgen A. 2013. Hepatic excretory function in sepsis: implications from biophotonic analysis of transcellular xenobiotic transport in a rodent model. *Crit Care*, 17(2):R67.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170(1):e123–34.
- Gonzalez-Alonso J. 2012. Human thermoregulation and the cardiovascular system. *Exp Physiol*, 97(3):340–6.
- Hackam DG, Redelmeier DA. 2006. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*, 296(14):1731–2.
- Hankenson FC, Ruskoski N, van Saun M, Ying GS, Oh J, Fraser NW. 2013. Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 52(3):277–85.
- Hart BL. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*, 12(2):123–37.
- Holman C, Piper SK, Grittner U, Diamantaras AA, Kimmelman J, Siegerink B, Dirnagl U. 2016. Where Have All the Rodents Gone? The Effects of Attrition in Experimental Research on Cancer and Stroke. *PLoS Biol*, 14(1):e1002331.

- Hunter JE, Butterworth J, Perkins ND, Bateson M, Richardson CA. 2014. Using body temperature, food and water consumption as biomarkers of disease progression in mice with Emu-myc lymphoma. *Br J Cancer*, 110(4):928–34.
- Iqbal SA, Wallach JD, Khoury MJ, Schully SD, Ioannidis JP. 2016. Reproducible Research Practices and Transparency across the Biomedical Literature. *PLoS Biol*, 14(1):e1002333.
- Iskander KN, Craciun FL, Stepien DM, Duffy ER, Kim J, Moitra R, Vaickus LJ, Osuchowski MF, Remick DG. 2013a. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. *Crit Care Med*, 41(1):159–70.
- Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, Remick DG. 2013b. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev*, 93(3):1247–88.
- Jbeily N, Claus RA, Dahlke K, Neugebauer U, Bauer M, Gonnert FA. 2014. Comparative suitability of CFDA-SE and rhodamine 6G for in vivo assessment of leukocyte-endothelium interactions. *J Biophotonics*, 7(6):369–75.
- Jennings M, Morton DB, Charton E, Cooper J, Hendriksen C, Martin S, Pearce MC, Price S, Redhead K, Reed N, Simmons H, Spencer S, Willingale H. 2010. Application of the Three Rs to challenge assays used in vaccine testing: tenth report of the BVAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Biologicals*, 38(6):684–95.
- Kellum JA, Song M, Venkataraman R. 2004. Hemoadsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor-kappaB DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. *Crit Care Med*, 32(3):801–5.
- Khan AI, Coldewey SM, Patel NS, Rogazzo M, Collino M, Yaqoob MM, Radermacher P, Kapoor A, Thiernemann C. 2013. Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction in experimental sepsis in mice via activation of the beta-common receptor. *Dis Model Mech*, 6(4):1021–30.
- Kort WJ, Hekking-Weijma JM, TenKate MT, Sorm V, VanStrik R. 1998. A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. *Lab Anim*, 32(3):260–9.

- Lambeck S, Weber M, Gonnert FA, Mrowka R, Bauer M. 2012. Comparison of sepsis-induced transcriptomic changes in a murine model to clinical blood samples identifies common response patterns. *Front Microbiol*, 3:284.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W, American Society of Echocardiography's N, Standards C, Task Force on Chamber Q, American College of Cardiology Echocardiography C, American Heart A, European Association of Echocardiography ESoC. 2006. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr*, 7(2):79–108.
- Lilley E, Armstrong R, Clark N, Gray P, Hawkins P, Mason K, Lopez-Salesansky N, Stark AK, Jackson SK, Thiemermann C, Nandi M. 2015. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock*, 43(4):304–16.
- Lin X, Lee D, Wu D. 2014. Sabiporide improves cardiovascular function and attenuates organ injury from severe sepsis. *J Surg Res*, 188(1):231–7.
- Link A, Bohm M. 2014. [New options in the treatment of acute heart failure]. *Internist (Berl)*, 55(6):655–62.
- Marris E. 2006. Animal research: grey matters. *Nature*, 444(7121):808–10.
- Marshall JC. 2014. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, 20(4):195–203.
- Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. 1990. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ*, 300(6719):230–5.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1):4–11.
- Minnecci PC, Deans KJ, Hansen B, Parent C, Romines C, Gonzales DA, Ying SX, Munson P, Suffredini AF, Feng J, Solomon MA, Banks SM, Kern SJ, Danner RL, Eichacker PQ, Natanson C, Solomon SB. 2007. A canine model of septic shock: balancing animal welfare and scientific relevance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(4):H2487–500.
- Moitra R, Beal DR, Belikoff BG, Remick DG. 2012. Presence of preexisting antibodies mediates survival in sepsis. *Shock*, 37(1):56–62.
- Molins CR, Delorey MJ, Young JW, Yockey BM, Belisle JT, Schriefer ME, Petersen JM. 2012. Use of temperature for standardizing the progression of *Francisella tularensis* in mice. *PLoS One*, 7(9):e45310.
- Nat Med, Focus on Sepsis. 2012. Focus on sepsis. *Nat Med*, 18(7):997.

- Newsom DM, Bolgos GL, Colby L, Nemzek JA. 2004. Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 43(5):13–8.
- Nylen ES, Whang KT, Snider J R H, Steinwald PM, White JC, Becker KL. 1998. Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med*, 26(6):1001–6.
- Okajima K, Imamura H, Koga S, Inoue M, Takatsuki K, Aoki N. 1990. Treatment of patients with disseminated intravascular coagulation by protein C. *Am J Hematol*, 33(4):277–8.
- Osterburg AR, Robinson CT, Mokashi V, Stockelman M, Schwemberger SJ, Chapman G, Babcock GF. 2014. Oral tungstate (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>) exposure reduces adaptive immune responses in mice after challenge. *J Immunotoxicol*, 11(2):148–59.
- Osuchowski MF, Connett J, Welch K, Granger J, Remick DG. 2009. Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. *Crit Care Med*, 37(5):1567–73.
- Osuchowski MF, Craciun F, Weixelbaumer KM, Duffy ER, Remick DG. 2012. Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J Immunol*, 189(9):4648–56.
- Osuchowski MF, Remick DG, Lederer JA, Lang CH, Aasen AO, Aibiki M, Azevedo LC, Bahrami S, Boros M, Cooney R, Cuzzocrea S, Jiang Y, Junger WG, Hirasawa H, Hotchkiss RS, Li XA, Radermacher P, Redl H, Salomao R, Soebandrio A, Thiemermann C, Vincent JL, Ward P, Yao YM, Yu HP, Zingarelli B, Chaudry IH. 2014. Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock*, 41(6):463–75.
- Osuchowski MF, Siddiqui J, Copeland S, Remick DG. 2005. Sequential ELISA to profile multiple cytokines from small volumes. *J Immunol Methods*, 302(1-2):172–81.
- Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. 2006. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*, 177(3):1967–74.
- Osuchowski MF, Welch K, Yang H, Siddiqui J, Remick DG. 2007. Chronic sepsis mortality characterized by an individualized inflammatory response. *J Immunol*, 179(1):623–30.
- Otto GP, Grunwald B, Geis C, Kothe S, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Ekaney M, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Busch M, Claus RA. 2015. Impact of antibiotic treatment

- intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. *Nephron*, 129(2):137–42.
- Otto GP, Neugebauer S, Claus RA, Sossdorf M. 2012. Arginine metabolism is markedly impaired in polymicrobial infected mice. *Crit Care*, 16(2):412.
- Panayiotou CM, Baliga R, Stidwill R, Taylor V, Singer M, Hobbs AJ. 2010. Resistance to endotoxic shock in mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Br J Pharmacol*, 160(8):2045–54.
- Pape HC, Kurtz A, and SS. 2014. *Physiologie*, Bd 7. Georg Thieme Verlag.
- Paris A, Ohlendorf C, Marquardt M, Bein B, Sonner JM, Scholz J, Tonner PH. 2005. The effect of meperidine on thermoregulation in mice: involvement of alpha2-adrenoceptors. *Anesth Analg*, 100(1):102–6.
- Pohl M, Schmiegel W. 2013. [Colorectal cancer - personalized, stage-adjusted tumour therapy]. *Dtsch Med Wochenschr*, 138(36):1790–5.
- Press AT, Traeger A, Pietsch C, Mosig A, Wagner M, Clemens MG, Jbeily N, Koch N, Gottschaldt M, Beziere N, Ermolayev V, Ntziachristos V, Popp J, Kessels MM, Qualmann B, Schubert US, Bauer M. 2014. Cell type-specific delivery of short interfering RNAs by dye-functionalised theranostic nanoparticles. *Nat Commun*, 5:5565.
- Prondzinsky R, Winkler M. 2014. Medikamentöse Therapie der akuten Herzinsuffizienz und des infarktbedingten kardiogenen Schocks. *Kardiologie up2date*, 10/2014:110–117.
- Raeven P, Feichtinger GA, Weixelbaumer KM, Atzenhofer S, Redl H, Van Griensven M, Bahrami S, Osuchowski MF. 2012. Compartment-specific expression of plasminogen activator inhibitor-1 correlates with severity/outcome of murine polymicrobial sepsis. *Thromb Res*, 129(5):e238–45.
- Raeven P, Salibasic A, Drechsler S, Weixelbaumer KM, Jafarmadar M, van Griensven M, Bahrami S, Osuchowski MF. 2013. A non-lethal traumatic/hemorrhagic insult strongly modulates the compartment-specific PAI-1 response in the subsequent polymicrobial sepsis. *PLoS One*, 8(2):e55467.
- Ray MA, Johnston NA, Verhulst S, Trammell RA, Toth LA. 2010. Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49(3):282–8.

- Recknagel P, Claus RA, Neugebauer U, Bauer M, Gonnert FA. 2012a. In vivo imaging of hepatic excretory function in the rat by fluorescence microscopy. *J Biophotonics*, 5(7):571–81.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M. 2013. Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int*, 33(2):283–93.
- Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carre JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. 2012b. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med*, 9(11):e1001338.
- Redl H, Schlag G, Togel E, Assicot M, Bohuon C. 2000. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin. *Crit Care Med*, 28(11):3659–63.
- Rembert MS, Smith JA, Hosgood G. 2004. A comparison of a forced-air warming system to traditional thermal support for rodent microenvironments. *Lab Anim*, 38(1):55–63.
- Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. 2002. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*, 17(6):463–7.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 4(1):31–6.
- Rosadini CV, Kagan JC. 2016. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol*, 44:14–19.
- Rudiger A, Dyson A, Felsmann K, Carre JE, Taylor V, Hughes S, Clatworthy I, Protti A, Pellerin D, Lemm J, Claus RA, Bauer M, Singer M. 2013. Early functional and transcriptomic changes in the myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 124(6):391–401.
- Russell WMS, Burch RL. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co, London.

- Sanchez BM, Lesch M, Brammer D, Bove SE, Thiel M, Kilgore KS. 2008. Use of a portable thermal imaging unit as a rapid, quantitative method of evaluating inflammation and experimental arthritis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 57(3):169–75.
- Schauer DP, Leonard AC, Hornung RW, Johnston JA, Eckman MH. 2008. Patient-specific decision modeling to guide the use of drotrecogin alpha (activated) in patients with severe sepsis. *J Crit Care*, 23(4):484–92.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Inflammation, Host Response to Injury LSCRP. 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(9):3507–12.
- Sessler DI. 2008. Temperature monitoring and perioperative thermoregulation. *Anesthesiology*, 109(2):318–38.
- Sessler DI. 2009. Thermoregulatory defense mechanisms. *Crit Care Med*, 37(7 Suppl):S203–10.
- Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. 2016. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep*, 18(11):37.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8):801–10.
- Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa B, Seidel C, Schreppe A, Bockmeyer CL, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rodel J, Claus RA, Otto GP. 2013. Physical exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*, 41(10):e246–55.
- Takao K, Hagihara H, Miyakawa T. 2015. Reply to Warren et al. and Shay et al.: Commonalities across species do exist and are potentially important. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(4):E347–8.

- Takao K, Miyakawa T. 2015. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(4):1167–72.
- Tepper M, Shoval A, Hoffer O, Confino H, Schmidt M, Kelson I, Keisari Y, Gannot I. 2013. Thermographic investigation of tumor size, and its correlation to tumor relative temperature, in mice with transplantable solid breast carcinoma. *J Biomed Opt*, 18(11):111410.
- Tierschutzbericht der Bundesregierung. 2015. Tierschutzbericht der Bundesregierung 2015. Report.
- Trammell RA, Toth LA. 2011. Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research. *Comp Med*, 61(6):492–8.
- Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM. 2004. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock*, 21(2):121–5.
- Vincent JL, Opal SM, Marshall JC. 2010. Ten reasons why we should NOT use severity scores as entry criteria for clinical trials or in our treatment decisions. *Crit Care Med*, 38(1):283–7.
- Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ. 2005. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock*, 23(4):291–7.
- Vyas D, Javadi P, Dipasco PJ, Buchman TG, Hotchkiss RS, Coopersmith CM. 2005. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(4):R1048–53.
- Wang CH, Gee MJ, Yang C, Su YC. 2006. A new model for outcome prediction in intra-abdominal sepsis by the linear discriminant function analysis of IL-6 and IL-10 at different heart rates. *J Surg Res*, 132(1):46–51.
- Warn PA, Brampton MW, Sharp A, Morrissey G, Steel N, Denning DW, Priest T. 2003. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Lab Anim*, 37(2):126–31.
- Weixelbaumer KM, Raeven P, Redl H, van Griensven M, Bahrami S, Osuchowski MF. 2010. Repetitive low-volume blood sampling method as a feasible monitoring tool in a mouse model of sepsis. *Shock*, 34(4):420–6.

- Wenzel RP, Edmond MB. 2000. Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med*, 343(26):1961–3.
- Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster HP, Brunkhorst FM. 2015. *Sepsis und MODS*. Springer-Verlag.
- Wu L, Xu L, Xu X, Fan X, Xie Y, Yang L, Lan W, Zhu J, Xu G, Dai J, Jiang Y, Liu X. 2014. Keep warm and get success: the role of postischemic temperature in the mouse middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res Bull*, 101:12–7.
- Xie C, Wei W, Zhang T, Dirsch O, Dahmen U. 2014. Monitoring of systemic and hepatic hemodynamic parameters in mice. *J Vis Exp*, (92):e51955.
- Young CC, Sladen RN. 1996. Temperature monitoring. *Int Anesthesiol Clin*, 34(3):149–74.

**Abbildungsverzeichnis**

1	Entnommen aus „Novel strategies for the treatment of sepsis“ (Riedemann et al. 2003). . . . .	3
2	Ablaufschema der durchgeführten Versuche. . . . .	21
3a	Fotografie eines Prototypen des Infrarotthermographiesystems. . . . .	23
3b	Fotografie des Infrarotkamarasystems. . . . .	24
4	Darstellung des Messaufbaus und der Messwertaufnahme. . . . .	25
5	Darstellung des Hysterese Modells. . . . .	26
6	Ausschnitt einer Rohdatendatei. . . . .	29
7	Darstellung der Berechnung der Messwerte. . . . .	30
8	Weiterverarbeitung der Daten des Versuchstieres. . . . .	31
9	Darstellung einer exemplarisch fertig verarbeiteten Messwerttabelle. . . . .	32
10	Darstellung des physiologischen Temperaturverlaufs . . . . .	33
11	Darstellung des Temperaturverlaufes von überlebenden Versuchstieren ohne antibiotische Therapie . . . . .	34
12	Darstellung der überlebenden Versuchstiere ohne antibiotische Therapie . . . . .	35
13	Darstellung der Temperatur von versterbenden Tieren ohne antibiotische Therapie . . . . .	38
14	Todespunktzentrierte Analyse der versterbenden Tiere. . . . .	39
15	Überlebende Versuchstiere mit antibiotischer Intervention. . . . .	40
16	Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie. . . . .	41
17	Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie. . . . .	42
18	Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie . . . . .	43
19	Darstellung der versterbenden Versuchstiere mit antibiotischer Therapie, gemessen mit AUGUR 2.0. . . . .	44
20	Vergleich der Temperaturverlaufskurven von konservativ und antibiotisch behandelten Versuchstieren. . . . .	46
21	Vergleich der überlebenden und versterbenden Versuchstiere mit und ohne antibiotische Therapie. . . . .	47
22	Vergleich der überlebenden und versterbenden Versuchstiere mit und ohne antibiotische Therapie. . . . .	48
23	Darstellung der septischen Wirtsreaktion unter Einsatz von Lipopolysaccharid. . . . .	50
24	Darstellung der septischen Wirtsreaktion bei Einsatz von Zymosan. . . . .	51
25	Darstellung der antibiotisch behandelten Versuchstiere, observiert mit AUGUR 1.0. . . . .	53
26	Testung von Thyreomimetika mit AUGUR 1.0 ohne antibiotische Therapie. . . . .	54

27	Testung von Sphingomyelinaseinhibitoren. . . . .	56
28	Testung von Wolframat. . . . .	58
29	Darstellung einer Verlaufsbeobachtung gesunder Tiere mit AUGUR 1.0. . . . .	59
30	Testung von Thyreomimetika. . . . .	61
31	Darstellung der Balb/c Wildtyp und C5a-Rez.Knockout-Mäuse. . . . .	64
32	Darstellung der Balb/c Wildtyp und C5a-Rez.Knockout-Mäuse. . . . .	65
33	Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxygenase-Knockout-Mäuse. . . . .	67
34	Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxygenase-Knockout-Mäuse. . . . .	68
35	Darstellung der FVB Wildtyp und Hämoxygenase-Knockout-Mäuse. . . . .	68
36	Darstellung der Konsistenz der Körperoberflächenthermographie in den verschiedenen vorher beschriebenen Versuchsreihen in der Diskrimination von SUR und NON-SUR. . . . .	70
37	Darstellung des Verlaufs des Clinical Severity Score und des Körpergewichts der Versuchstiere. . . . .	71
38	Darstellung der ROC-Kurven sowie der Analysen der drei überprüften Para- meter 12 Stunden vor dem Tod bzw. Versuchsende. . . . .	73
39	Darstellung der Validität der Vorhersagewerte der einzelnen Stratifizierungs- methoden. . . . .	74
40	Kaplan-Meier-Analyse für den Zeitraum nach Erreichen des Cut-Off-Wertes. . . . .	77

**Tabellenverzeichnis**

1	Auflistung der Herkunft der Versuchstiere . . . . .	19
2	CSS-Score . . . . .	79
3	Vor- und Nachteile der verschiedenen Stratifizierungsmethoden . . . . .	92

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- apl. Prof. Dr. rer. nat. med. Ralf A. Claus
- Prof. Baniahmad
- Prof. Kamradt
- Prof. Alexander Richter
- Dr. med. Dr. rer. nat. Gordon P. Otto
- Christian Queissner, Dipl.Ing (FH), M.Eng.
- Dr. Maik Sossdorf,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 05. Juni 2017

---

Unterschrift

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen bedanken, welche mich bei der Bearbeitung des Projekt und der Erstellung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Aus fachlicher Sicht möchte ich zunächst meinem Doktorvater Ralf A. Claus für die zuvorkommende Betreuung der Doktorarbeit, die gewährten Freiheiten bei der Umsetzung des Projektes und der umfassenden Unterstützung während der Erstellung der Dissertation bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christian Queissner bedanken, welcher einen unschätzbaren Anteil an der Umsetzung des AUGURs hatte - ich werde die Diskussionen zwischen Informatiker und Mediziner/Softwareanwender nicht vergessen.

Auch bedanken möchte ich mich bei Oliver Sommerfeld und Franziska Schleser für Ihre Mit- und Zuarbeit während der Betreuung der Versuche sowie Rat und Tat bei der statistischen Auswertung. Mein besonderer Dank gilt auch Matthias Steinmetz, ohne dich sähe diese Dissertation bei weitem nicht so aus - herzlichen Dank für die vielen Stunden!

Bedanken möchte ich mich auch bei den unermüdlichen Korrekturlesern Roland John, Alexandra Wallbraun und meinem Vater Jens Rothe.

Selbstverständlich soll auch all jenen gedankt sein, die an dieser Stelle keine persönliche Erwähnung gefunden haben, mich aber dennoch unterstützt haben, insbesondere die MTAs aus der Arbeitsgruppe und der Tierhaltung im FZL.

Das größte Dankeschön gilt jedoch meiner Familie! Dankeschön Antonia, dass du mir während der ganzen Zeit der Promotion den Rücken freigehalten und mich vorbehaltlos unterstützt hast. Danke Hannah, dass du deinen Papa so oft entbehrt hast. Und vielen Dank an meine Eltern, die mir all das mitgegeben haben, um an diesen Punkt zu kommen. Da ihr alle auch in schwierigen Zeiten zu mir gehalten, mich unterstützt und aufgebaut habt, könnt ihr heute diese Zeilen an dieser Stelle lesen! VIELEN DANK!